

Aus dem Otto-Heubner-Centrum für Kinder und Jugendmedizin
Klinik für Pädiatrie m. S. Onkologie / Hämatologie
(Prof. Dr. med. Dr. H.c. G. Henze)

HABILITATIONSSCHRIFT

Rezidive von akuten lymphoblastischen Leukämien im Kindesalter Molekulargenetik - Zellbiologie - Klinik und Prognose

zur Erlangung der Venia legendi für das Fach Pädiatrie
Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum

Dr. rer. nat. Dr. med. Karlheinz Seeger

Präsident: Prof. Dr. med. Jürgen Mlynek
Dekan: Prof. Dr. J. W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. Dr. h.c. G. Henze
2. Prof. Dr. K. Welte
3. Prof. Dr. U. Göbel

eingereicht: 03. März 2003

Datum der Habilitation: 23. Oktober 2003

Meiner Familie gewidmet.

INHALTSVERZEICHNIS

1	VORWORT	5
2	EINFÜHRUNG	6
2.1	AKUTE LYMPHOBLASTISCHE LEUKÄMIEN (ALL) IM KINDESALTER	6
2.1.1	Klinische Studien zur Behandlung von Kindern mit ALL	6
2.1.1.1	ALL-Ersterkrankungen	6
2.1.1.2	ALL-Rezidive	8
2.2	FRAGESTELLUNG UND EINORDNUNG DER EIGENEN PROJEKTE BEI ALL-REZIDIVEN	10
2.3	HÄMATOPOESE UND GENETISCHE VERÄNDERUNGEN BEI ALL	16
2.3.1	Differenzierung und Reifung lymphatischer Zellreihen	18
2.3.2	B-Zellspezifisierung und –bestimmung	19
2.3.3	T-Zellspezifisierung und -bestimmung	21
2.4	TRANSLOKATIONSLEUKÄMIEN UND FUSIONSGENE	22
2.4.1	Chromosomale Translokationen	22
2.4.2	Prognose	24
2.4.3	Molekulare Ziele	24
2.4.4	Therapeutische Strategien	26
3	ZUSAMMENFASSUNG DER PUBLIZIERTEN FORSCHUNGSERGEBNISSE - WISSENSCHAFTLICHE PROJEKTE -	28
3.1	PROJEKT 1: FUSIONSGENE BEI ALL-REZIDIVEN IM KINDESALTER	28
3.1.1	Translokationsleukämien bei ALL-Rezidiven	28
3.1.2	<i>TEL-AML1</i> Fusion bei ALL	30
3.1.2.1	Transkriptionsfaktor TEL	30
3.1.2.2	Transkriptionsfaktor AML1	32
3.1.2.3	<i>TEL-AML1</i> positive ALL	34
3.1.3	Translokationsleukämien – Prävalenz und Prognosefaktor beim Rezidiv	37
3.1.3.1	Klinische Signifikanz von <i>TEL-AML1</i> bei ALL-Rezidiven	39
3.1.4	Zusammenfassende Diskussion: <i>TEL-AML1</i> positive ALL	41
3.1.4.1	Therapiestratifizierung und Intensität der Behandlung	42
3.1.4.2	Einfluss der Beobachtungszeitdauer auf die Prognose	43
3.1.4.3	Einfluss der Chemotherapeutika auf die Therapieeffizienz	43
3.1.4.4	Einfluss von wirtseigenen Faktoren	44
3.1.5	<i>BCR-ABL</i> positive ALL	45
3.1.5.1	Klinische Signifikanz von <i>BCR-ABL</i> bei ALL-Rezidiven	45
3.1.5.2	Zusammenfassende Diskussion: <i>BCR-ABL</i> positive ALL-Rezidive	46
3.1.6	Publikationen zum Projekt 1	48
3.2	PROJEKT 2: MRD UND ANTIGENREZEPTOR-GENUMLAGERUNGEN BEI ALL-REZIDIV	49
3.2.1	Quantitative Bestimmung der Leukämiezelllast	49
3.2.2	MRD-Studien bei ALL im Kindesalter	50
3.2.2.1	MRD-Studie bei ALL-Ersterkrankungen	50
3.2.2.2	Klinische Signifikanz von MRD-Analysen bei ALL-Rezidiven	51
3.2.2.3	Quantifizierung der Leukämiezelllast bei Translokationsleukämien	52
3.2.3	Zusammenfassung: Signifikanz von MRD bei ALL-Rezidiven	54
3.2.4	Publikationen zum Projekt 2	56
3.3	PROJEKT 3: DNA-DOPPELSTRANGBRUCH-REPARATUR	57
3.3.1	DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur	57
3.3.2	Mutationen im <i>NBS1</i> -Gen	57
3.3.2.1	<i>NBS1</i> -Mutationen bei ALL-Rezidiven	59
3.3.3	Zusammenfassung: <i>NBS1</i> -Mutationen bei ALL-Rezidiven	61
3.3.4	Publikationen zum Projekt 3	62

3.4	PROJEKT 4: ZELLZYKLUS, ZELLZYKLUSKONTROLLE	63
3.4.1	Regulation des Zellzyklus	64
3.4.2	Die Tumorsuppressorproteine p16 ^{INK4a} , p15 ^{INK4b} , p19 ^{INK4d}	65
3.4.2.1	Alterationen des <i>INK4</i> -Locus bei ALL im Kindesalter	65
3.4.2.2	Deletionen des <i>INK4</i> -Locus bei ALL im Kindesalter	66
3.4.2.3	Methylierung des <i>INK4a/b</i> -Promotors bei ALL im Kindesalter	67
3.4.2.4	Zyklusabhängige Kinase CDK4	67
3.4.3	Homozygote <i>p16</i> ^{INK4a} - und <i>p15</i> ^{INK4b} -Deletionen bei ALL-Rezidiven	68
3.4.4	<i>INK4b</i> -Promotormethylierung	70
3.4.5	Mutationsanalyse der <i>INK4</i> -Bindungsstelle von <i>CDK4</i> bei ALL	72
3.4.6	Publikationen zum Projekt 4	73
3.5	PROJEKT 5: ZYTOKINE UND ZYTOKINREZEPTOREN BEI ALL	74
3.5.1	Zytokin-/Zytokinrezeptoren	74
3.5.2	Zytokine und deren Stellenwert in der Tumorimmunologie	74
3.5.3	Zytokine/Zytokinrezeptor-Expression bei ALL	75
3.5.3.1	Expressionsanalysen bei ALL-Rezidiven	75
3.5.4	Zytokin/Zytokinrezeptor <i>splice</i> -Varianten	81
3.5.4.1	Zytokinvarianten	81
3.5.4.2	Zytokinrezeptoren	82
3.5.4.3	<i>IL-7R</i> - und <i>IL-4R</i> -Varianten	83
3.5.5	Zusammenfassung: Zytokin/Zytokinrezeptoren bei ALL	86
3.5.5.1	Publikationen zum Projekt 5	88
3.6	PROJEKT 6: HEREDITÄRE POLYMORPHISMEN VON ZYTOSTATIKA-METABOLISIERENDEN ENZYSYSTEMEN BEI KINDERN MIT ALL-REZIDIV	89
3.6.1	Hereditäre Polymorphismen und Malignomrisiko	89
3.6.1.1	Glutathion-S-Transferasen GST	90
3.6.1.2	<i>CYP1A1</i> -Genotyp	92
3.6.2	Zusammenfassende Diskussion: Hereditäre Polymorphismen und ALL-Rezidiv	95
4	AUSBLICK: ALL-REZIDIVE IM KINDESALTER	99
5	PUBLIKATIONSLISTE	102
6	VORTRÄGE UND POSTER	106
7	BUCHBEITRÄGE	113
8	REFERENZEN	116

1 VORWORT

Trotz der intensiven, risikoadaptierten Induktions- und Postremissionstherapie erleiden 25 - 30 % der Kinder mit akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) ein Rezidiv. Die adäquate Behandlung dieser Patientengruppe, die bereits eine intensive Therapie erhalten hat und die die vierthäufigste Entität pädiatrischer Neoplasien darstellt, stellt somit eine besondere Herausforderung in der pädiatrischen Onkologie dar. Zu den wichtigsten Zielen der Therapieoptimierungsstudien ALL-REZ BFM (Berlin-Frankfurt-Münster), neben der vorrangigen Implementierung und Evaluation risikoadaptierter Behandlungsstrategien, gehört die Ermittlung bisher unbekannter Faktoren, aufgrund welcher es zum Rezidiv kommt und die zur Risikostratifizierung herangezogen werden können.

Bereits 1988 hat eine Arbeitsgruppe mit der wertvollen Unterstützung von Prof. Dr. Dr. h.c. G. Henze (Charité) unter meiner Leitung mit dem Aufbau des molekulargenetischen Labors der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie/Hämatologie begonnen. Begleitend zu den klinischen Erkenntnissen haben wir genetische Veränderungen in und molekulare Charakteristika von Leukämiezellen zum Zeitpunkt des ALL-Rezidivs sowie den Einfluss von wirtseigenen Faktoren untersucht. In der vorliegenden Arbeit werden die Erkenntnisse der in dieser Zeit von uns initiierten Vorhaben in sechs Projekte zusammengefasst. Unser Labor stellt heutzutage das Referenzlabor für ALL-Rezidiv dar. Die Identifizierung spezifischer, prognostisch-relevanter, genetischer Merkmale in den Leukämiezellen von Kindern mit ALL-Rezidiv ist ein wesentliches Ergebnis unserer Analysen. Die Kinetik der Leukämiezellreduktion und damit die Reaktion auf die Therapie sowie die Prognose lässt sich durch die Verwendung dieser Marker zuverlässiger bewerten. Die genetische Typisierung und das molekulare Ansprechen auf die Therapie ergänzen heute die klinischen Determinanten zur Risikostratifizierung der Kinder mit ALL-Rezidiv der derzeitigen Therapieoptimierungsstudie ALL-REZ BFM 2003 (Leitung Prof. Dr. G. Henze).

Die Beteiligung unserer Arbeitsgruppe am Nationalen Genomforschungsnetz seit zwei Jahren eröffnet die Möglichkeit über die einzelnen genetischen Veränderungen hinaus genomweite Expressionsprofile und DNA-Modifikationen zu analysieren. Sie erlauben einen umfassenderen Einblick in die molekularen Veränderungen in den Leukämiezellen sowie in den Mechanismen der Leukämogenese. Neben prognostischen könnten diese Erkenntnisse auch Implikationen für neuartige, molekulare Therapieformen haben.

2 EINFÜHRUNG

Während der letzten drei Jahrzehnte wurden signifikante Verbesserungen der Langzeitheilungschancen von Kindern mit akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) durch Behandlungsprotokolle erreicht, die dem Rezidivrisiko angepasst waren. Begleitet wurden diese therapeutischen Erfolge von einem beachtlichen Erkenntnisgewinn über die molekularen Faktoren, die die normale hämatopoetische Differenzierung, Proliferation, Zellzykluskontrolle, DNA-Reparatur und Apoptose steuern und die bei Leukämien verändert sind. Neben deren Bedeutung für die Pathogenese, Klassifikation und Prognose der ALL stellen diese Veränderungen potentielle therapeutische Ziele dar, die bei einzelnen ALL-Subgruppen bereits zur Erprobung spezifischer Substanzen oder Strategien geführt haben.

2.1 AKUTE LYMPHOBLASTISCHE LEUKÄMIEN (ALL) IM KINDESALTER

2.1.1 Klinische Studien zur Behandlung von Kindern mit ALL

2.1.1.1 ALL-Ersterkrankungen

Im Kindesalter stellt die akute lymphoblastische Leukämie die häufigste maligne Erkrankung (30 %) dar. Jährlich erkranken ungefähr 550 Kinder bis zum vollendeten 14. Lebensjahr in der Bundesrepublik Deutschland an einer ALL (<http://www.kinderkrebsregister.de/>). In einer aktuellen Zusammenstellung wurden die Langzeittherapieergebnisse von 12 ALL-Studiengruppen der Industrienationen in der Fachzeitschrift *Leukemia* publiziert [AIEOP (Italien),¹ BFM (Deutschland),² CCG (USA),³ CoALL (Deutschland),⁴ DCLSG (Niederlande),⁵ DFCI (USA),⁶ CLCG-EORTC (Frankreich),⁷ NOPHO (Dänemark, Finnland, Island, Norwegen, Schweden),⁸ POG (USA),⁹ St. Jude (USA),¹⁰ Tokio-CCSG (Japan),¹¹ UKALL (Großbritannien)¹². Bei diesen retrospektiven Auswertungen auf Grundlage der NCI/Rom-Kriterien wurde das initiale Ansprechen auf die Therapie (Reduktion der Leukämiezelllast) zur Beurteilung des Therapieerfolgs nicht einbezogen.

In Abhängigkeit von der Zusammensetzung, der Dosisintensität und der zeitlichen Abfolge der Medikamente, dem Zeitpunkt der Behandlungsintensivierung sowie der Dauer der Therapie differieren die Überlebenschancen der Kinder mit ALL. Die besten der von den Studiengruppen jeweils erzielten langzeitereignisfreien Überlebensraten waren nach 5 Jahren in nicht selektierten Patientenkollektiven zwischen 63 bis 83 %, nach 8 Jahren (soweit angegeben)

zwischen 60¹² bis 76 %. ² Die Wahrscheinlichkeiten des Langzeitüberlebens nach 8 Jahren (soweit angegeben) betragen zwischen 77 bis 84 %.

Risikoabschätzung und Therapiestratifizierung bei ALL-Ersterkrankung

Eine kontinuierliche Forderung an die Behandlung von Kindern mit ALL ist die Wahl der optimalen individuellen Therapiemöglichkeit. In der Vergangenheit zeichneten sich die konsekutiven Therapieregime durch eine ständige Intensivierung der systemischen Behandlung und der intrathekalen Therapie bei gleichzeitiger Reduktion der Bestrahlungsintensität aus. Derzeitig verwendete Kriterien zur Abschätzung des Rezidivrisikos erlauben eine zuverlässigere frühzeitige Beurteilung des Therapieerfolgs und damit auch eine Reduktion der Therapieintensität bei bestimmten Patientenentitäten.

Die ALL-Behandlungsstrategien setzen sich aus einer intensiven Induktions-, Konsolidierungs- und Reinduktionstherapie sowie einer gemäßigten Erhaltungstherapie (Dauertherapie) zusammen. Eine hämatologische Remission wird bei über 95 % der Kinder durch die ALL-Erstbehandlungsstudien in Deutschland (BFM, Berlin-Frankfurt-Münster; CoALL, Cooperative ALL-Studie) erreicht. Die Erfassung prognostischer Faktoren zur Abschätzung des Rezidivrisikos bei ALL-Ersterkrankung, die bis vor 6 - 10 Jahren vorwiegend klinische und laborchemische Merkmale umfassten, ist angesichts des technischen und molekularbiologischen Fortschritts zunehmend umfangreicher und schwieriger geworden. Dennoch lassen sich Kinder mit ALL anhand klinisch-laborchemischer Eigenschaften zum Zeitpunkt der Diagnose bestimmten Risikogruppen zuteilen (s. Tabelle 1). Dieses Vorgehen zur Wahl der geeigneten Therapie ist gegenwärtig bei der Mehrheit der Kinder mit ALL zur risikoadaptierten Therapiestratifizierung noch zulässig. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die hierdurch definierte Risikogruppe eine sehr heterogene Patientenentität mit unterschiedlicher Prognose umfasst. In der Tabelle 1 sind die Risikofaktoren zur Therapiestratifizierung von Kindern mit ALL-Ersterkrankung zusammengestellt.

Neben klinischen, immunphänotypischen und zytogenetischen / molekularen Parametern hat sich gezeigt, dass die *in vivo* Reaktion auf Glukokortikoide während der zytoreduktiven Vorphase^{2,13} sowie der sensitive Nachweis der Leukämiezellzahlreduktion nach der Induktionstherapie wichtige prognostische Faktoren mit hohem prädiktiven Wert darstellen.¹⁴⁻¹⁶ Seit kurzem wird der molekulargenetische Nachweis von leukämischen Restzellen (MRD, *minimal residual disease*) anhand leukämiespezifischer Marker (Immunglobulin (Ig)- oder T-

Zellrezeptor (TZR)-Genrekombinationen) zur sensitiven Beurteilung des Ansprechens auf die Therapie als Kriterium zur Therapiestratifizierung von Kindern mit ALL herangezogen und dessen prognostische Bedeutung validiert (s. Projekt 2, Abschnitt 3.2).¹⁷

Tabelle 1: Prognosefaktoren bei ALL-Ersterkrankung

ALL-Risikogruppe	Anteil[%]	Merkmale
Standard (S)	65	Alter: 1-6 (-9) Jahre Leukozytenzahl: $< 20 (< 50) \times 10^3 / \mu\text{l}$ Immunphänotyp: non-T ALL Keine ungünstigen molekularen Befunde (t(9;22); t(4;11)) Anprechen auf die Therapie: <i>Prednison good response</i> (PGR) (Blasten $< 10^3 / \mu\text{l}$ an Tag 8) Exzellente molekulare <i>response</i> (MRD negativ)
Mittleres (M)	25	Alter: $> 6 (> 10)$ Jahre Leukozytenzahlen: $> 20 (> 50) \times 10^3 / \mu\text{l}$ Anprechen auf die Therapie: Intermediäre molekulare <i>response</i> (non-S; non-H)
Hoch (H)	10	Chromosomale Translokation: t(9;22); t(4;11) Hypodiploidie Anprechen auf die Therapie: <i>Prednison poor response</i> (PPR) (Blasten $> 10^3 / \mu\text{l}$ an Tag 8) Schlechte molekulare <i>response</i> (MRD $\geq 10^{-3}$)

2.1.1.2 ALL-Rezidive

Trotz der intensiven, risikoadaptierten Induktions- und Postremissionstherapie erleiden ungefähr 25 - 30 % der Kinder mit ALL ein Rezidiv (90 - 120 Kinder p.a. in der Bundesrepublik Deutschland). Durch die Verbesserung der Behandlungsprotokolle konnten die Heilungsraten von Kindern mit ALL-Ersterkrankung zwar zunehmend gesteigert werden, gleichzeitig ist diese Strategie jedoch möglicherweise für die Selektion eines Leukämiezellklons verantwortlich, der eine höhere Zytostatikaresistenz zum Zeitpunkt eines systemischen oder extramedullären Rezidivs aufweist.

Die Wahl der optimalen Therapie, d.h. eine dem Folge rezidivrisiko angemessene Behandlung, für Kinder mit ALL-Rezidiv benötigt eindeutige Kriterien für therapeutische Entscheidungen. Diese Notwendigkeit ergibt sich zwingend daraus, dass bei der Rezidivtherapie die Behandlungsintensität ohnehin höher ist, die Toleranz wegen der vorhergehenden Erstbehandlung gegenüber der Rezidivbehandlung eingeschränkt ist und weil nicht selten mit einer Heilung nur dann zu rechnen ist, wenn eine Stammzell-Transplantation durchgeführt wird. Stammzell-Transplantationen, insbesondere von HLA-passenden, nicht verwandten oder haploident-

schen Spendern sind mit einer noch höheren therapieassoziierten Mortalität und Morbidität behaftet als die konventionelle Chemotherapie. Folglich ist die Indikation zu einer solchen Maßnahme unter Berücksichtigung des Folgerezidivrisikos nach präzisen Kriterien sehr streng zu stellen.

Risikoabschätzung und Therapiestratifizierung bei ALL-Rezidiv

Bei einem Rezidiv einer ALL haben die konsekutiven Therapieoptimierungsprotokolle der BFM-Studiengruppe zur Behandlung von Kindern mit Rezidiv einer ALL, ALL-REZ BFM, ergeben, dass der Zeitpunkt (früh vs. spät) und der Ort des Rezidives (isoliert Knochenmark vs. Knochenmark kombiniert und isoliert extramedullär), sowie der ALL-Immunphänotyp (T vs. non-T) die wichtigsten prognostischen Faktoren sind.¹⁸⁻²¹ Aus der Kombination dieser drei prognostischen Merkmalen konnten vier Strategiegruppen (S1-S4) definiert werden (s. Tabelle 1): S1 (Anteil der Patienten 5 %), S2 (60 %), S3 (12 %) und S4 (23 %).

Tabelle 2: Therapiegruppen der Rezidivstudie ALL-REZ BFM 96

Lokalisation Zeitpunkt	Immunphänotyp: non – T			Immunphänotyp: (prä-) T		
	extramedullär	KM kombiniert	KM isoliert	extramedullär	KM kombiniert	KM isoliert
sehr früh ³	S2	S4	S4	S2	S4	S4
früh ²	S2	S2	S3	S2	S4	S4
spät ¹	S1	S2	S2	S1	S4	S4

¹ Rezidivdatum minus Datum nach Ende der vorherigen Therapie ≥ 6 Monate

² kein spätes und Rezidivdatum minus Datum der vorherigen Diagnose nach ≥ 18 Monaten

³ kein spätes und Rezidivdatum minus Datum der vorherigen Diagnose nach < 18 Monaten

Durch die intensivierte Blockchemotherapie kann bei den meisten Kindern mit ALL-Rezidiv eine zweite hämatologische Remission erreicht werden.²¹ Die Langzeitheilungschancen von Kindern mit ALL-Erstrezidiv, die entsprechend der Therapiestudien ALL-REZ der BFM-Gruppe behandelt wurden, liegen jedoch nur bei 40 % (s. zusammenfassende Darstellung in Protokoll ALL-REZ BFM Pilot 2002²¹). Das Ansprechen und die Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens von Kindern mit ALL-Rezidiv variiert nicht nur zwischen den einzelnen nach bisherigen prognoserelevanten Parametern definierten Strategiegruppen S1 - S4 sondern auch innerhalb der einzelnen Gruppen (v.a. in S2) teilweise signifikant.^{21,22} Die 5-Jahres-pEFS der 4 Strategiegruppen S1 - S4 beträgt: S1 78 %, S2 51 %, S3 27 % und S4 22 %.²¹

2.2 FRAGESTELLUNG UND EINORDNUNG DER EIGENEN PROJEKTE BEI ALL-REZIDIVEN

Obwohl die klinischen Parameter zur ALL-Klassifikation und zur Risikogruppenstratifizierung von Kindern mit ALL-Rezidiv sehr nützlich sind, existieren erhebliche Unterschiede im klinischen Verlauf sowohl zwischen Individuen der verschiedenen Risikogruppen als auch zwischen denen mit gleichen prognostischen Eigenschaften. So traten die meisten Rezidive bei Kindern auf, die bei der risikoadaptierten ALL-Erstbehandlung bisher dem Standard- oder mittleren Risikozweig zugeteilt waren. Ebenso erleidet aus unbekannten Gründen ein erheblicher Anteil der Kinder mit ALL-Ersterkrankung ein Rezidiv, deren Blasten das Fusionstranskript *TEL-AML1* exprimieren,²³⁻²⁶ dessen Vorhandensein mit einer günstigen Prognose assoziiert zu sein schien.²⁷⁻²⁹ Auch beim ALL-Rezidiv vermochten die bisher angewandten, vorwiegend klinischen Determinanten keine individuelle Aussage zum Rezidivrisiko und zur zuverlässigen Risikostratifizierung zu geben.

Zur exakteren Beschreibung und Klassifikation des ALL-Rezidiv haben wir in verschiedenen Projekten molekulare Charakteristika von und genetische Veränderungen in Leukämiezellen zum Zeitpunkt der Diagnose des ALL-Rezidivs analysiert, die eng mit der Pathogenese assoziiert sind. Ziel dieser Untersuchungen war es, zusammen mit der Analyse des molekularen Ansprechens auf die Therapie, prognostische Parameter mit hohem prädiktiven Wert zu definieren. Das Vorhandensein solcher Faktoren erlaubt eine zuverlässigere Stratifizierung (Therapiewahl) und trägt zur Vermeidung unnötiger Toxizitäten bei, wodurch die Heilungsraten von Kindern mit ALL-Rezidiv verbessert werden. Diese molekularen Studien wurden begleitend zu den Therapieoptimierungsprüfungen ALL-REZ BFM retrospektiv und prospektiv durchgeführt. In einem weiteren Vorhaben haben wir den Einfluss von wirtseigenen Faktoren, die mit der Leukämogenese und der Therapieresistenz assoziiert sind, auf die Therapie und Prognose von Kindern mit ALL-Rezidiv untersucht. Die Schwerpunkte und Ergebnisse unserer Untersuchungen werden nachstehend in den Projekten 1 bis 6, Abschnitte 3.1 bis 3.6, zusammengefasst.

Projekt 1, Abschnitt 3.1: Fusionsgene bei ALL-Rezidiven im Kindesalter

Leukämische Erkrankungen gehen mit einer aberranten Genexpression einher. Bei ALL im Kindesalter ist dies häufig die Konsequenz von molekularen Veränderungen in Transkriptionsfaktoren, Tyrosinkinase und chromatinmodulierenden Faktoren. Die Folge ist eine ge-

störte transkriptionelle Regulation und Expression von nachgeschalteten Genen sowie eine fehlerhafte zelluläre Lokalisierung der Proteinprodukte. Die durch die jeweilige genetische Veränderung verursachte Störung der Differenzierung, Proliferation und des Überlebens lymphatischer Leukämiezellen äußert sich ebenfalls in einer unterschiedlichen Prognose. Die Kenntnis dieser Aberrationen oder der von ihnen bewirkten Veränderungen könnte in Zukunft einen jeweils spezifischen therapeutischen Ansatz ermöglichen. Anlässlich dieser prognostischen und potentiell therapeutischen Bedeutung genetischer Veränderungen in Leukämiezellen haben wir die Prävalenz von Fusionsgenen, die aus chromosomalen Translokationen resultieren, in Leukämiezellen von Kindern mit ALL-Rezidiv über einen langen Zeitraum prospektiv und retrospektiv bestimmt sowie ihren prognostischen Stellenwert ermittelt. Wir konnten zeigen, dass definierte chromosomale Translokationen in Leukämiezellen von Kindern mit ALL-Erstrezidiv, die entsprechend der Therapiestudie ALL-REZ BFM behandelt wurden, mit signifikant unterschiedlichem Ansprechen auf die Therapie und ereignisfreiem Überleben assoziiert sind und zur Therapiestratifizierung genutzt werden können.^{24,30-32} Die Prävalenz beim ALL-Erstrezidiv erlaubt darüber hinaus Rückschlüsse über die Wirksamkeit der Therapie bei ALL-Ersterkrankung.

Projekt 2, Abschnitt 3.2 - MRD und Antigenrezeptorumlagerungen bei ALL-Rezidiven

Die Wirksamkeit einer ALL-Behandlung ist von der Reaktion der Leukämiezellen auf die angewandte Therapie und der erzielten Langzeitheilungsrate abhängig. Patienten, die eine gute und schnelle Reduktion ihrer Leukämiezelllast aufweisen, haben eine entsprechend bessere Prognose. Somit kommt dem Ansprechens auf die Therapie neben bestimmten genetischen Parametern als prädiktiver Faktor eine besondere Bedeutung zu. Die klassische zytomorphologische Bewertung der Remission läßt wegen der geringen Sensitivität nur bei den Patienten eine zuverlässige prognostische Einschätzung zu, die keine hämatologische Remission erreichen (ca. 5 %). In der großen Gruppe der Kinder mit ALL-Rezidiv, die eine Remission erreichen (ca. 95 %), vermag sie nicht zwischen Patienten mit hohem Rezidivrisiko und solchen mit exzellenter Prognose zu diskriminieren.

Im Projekt sind wir der Fragestellung nachgegangen, ob die Beurteilung der Remission während der Induktionstherapie durch sensitive und spezifische Methoden (PCR) zum quantitativen Nachweis von geringen Mengen an residuellen Leukämiezellen (MRD, *minimal residual disease*) eine zuverlässigere prognostische Einschätzung bei Kindern mit ALL-Erstrezidiv

zulässt und somit zur Stratifizierung und für Therapieentscheidungen herangezogen werden kann.²² Als klonspezifische Marker von ALL-Zellen wurden klonale Rekombinationen von Immunglobulin- (Ig-) und T-Zellrezeptor- (TZR-) -genen verwendet. Zur Erleichterung der aufwendigen Untersuchungen und zur Einsparung von Probenmaterial haben wir neue *screening* Methoden zum Nachweis klonaler Genumlagerungen der TZR- γ und - δ -Ketten entwickelt.^{33,34} Vergleichend mit diesen DNA-basierten Untersuchungen wurden MRD-Analysen mit leukämiespezifischer Fusions-cDNA durchgeführt. In dieser MRD-Analyse von Kindern mit ALL-Erstrezidiv konnten wir zeigen, dass dem Niveau an MRD zu bestimmten Zeitpunkten der Therapie eine wichtige prognostische Bedeutung zukommt.²² Eine prognostisch bedeutsame Auftrennung der obengenannten Strategiegruppen, gemessen an dem biologischen Verhalten der Leukämiezellen gegenüber der Therapie, scheint hierdurch möglich zu sein. Entsprechend werden in der jetzigen Rezidivstudie ALL-REZ BFM 2003 genetische Veränderungen in den Leukämiezellen (s. Projekt 1) und MRD-Kriterien zur Therapiestratifizierung hinzugezogen und prospektiv evaluiert.²¹

Projekt 3, Abschnitt 3.3 – DNA-Doppelstrangbruchreparatur

Chromosomale Translokationen sind ein charakteristisches Merkmal von ALL und werden direkt mit deren Entstehung in Verbindung gebracht. Aufgrund der physiologisch auftretenden DNA-Doppelstrangbrüche während der *V(D)J*- (variable, diversity, joining) Rekombinationen der Ig- und TZR-Gene im Laufe der Differenzierung tragen lymphatische Zellen ein besonderes Risiko für die Bildung von chromosomalen Translokationen. In den Zellen wird die Gefahr aberranter DNA-Verknüpfungen jedoch durch definierte Schutzmechanismen limitiert. Die an diesen Schutzmechanismen beteiligten Proteine kennzeichnen andererseits genetische Erkrankungen, die eine Störung der DNA-Reparatur, der Zellzykluskontrolle und eine höhere Suszeptibilität von lymphatischen Neoplasien aufweisen. Damit geht eine Immundefizienz und Chromosomeninstabilität sowie eine besondere Empfindlichkeit gegenüber ionisierenden Strahlen einher. Zu diesen gehört das Nijmegen Breakage Syndrom (NBS), die Ataxia telangiectasia (ATM, *AT mutated*) und die *AT-like disorder* (ATLD).

Gegenstand dieses Projekts ist die Mutationsanalyse in diesen Genen, speziell dem *NBS1*-Gen, bei ALL von ansonsten klinisch unauffälligen Patienten. In allen positiven Fällen wurde der Frage des Vorliegens einer Keimbahnmutation und von Veränderungen des anderen Allels nachgegangen. Die Antworten auf diese Fragen sind einmal von unmittelbar praktischer

Bedeutung für die Betreuung der Betroffenen und evtl. ihrer Familienangehörigen, zum anderen dürften sie wesentlich für das Verständnis der Pathogenese bestimmter Neoplasien sein. Diese Fragen erlangen eine besondere Relevanz angesichts der von uns erstmalig gefundenen hohen Inzidenz von (neu entdeckten) Mutationen im *NBS1*-Gen in Proben von Kindern mit ALL-Rezidiv. Wegen der potentiell erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Strahlen und anderer DNA-schädigender Substanzen bestimmter *NBS1*-Genotypen sollte erwogen werden, therapeutische Konzepte zu modifizieren.

Projekt 4, Abschnitt 3.4 – Zellzyklus-, Zellzykluskontrolle bei ALL-Rezidiven

Störungen des Zellzyklus werden zunehmend mit der Genese von Neoplasien in Verbindung gebracht. Interessant für die Pathogenese der ALL im Kindesalter ist dabei besonders die Untersuchung eines bestimmten Abschnittes des Zellzyklus. Hier wird, gesteuert durch die Tumorsuppressorproteine p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p19^{ARF} (INK, *inhibitor of kinase*; Proteine mit zellzyklushemmendem Effekt, zyklinabhängige Kinaseinhibitoren) und deren molekularem Bindungspartner CDK4 (CDK, *cyclin dependent kinase*) eine negative Wachstumskontrolle auf den Zellzyklus ausgeübt. Dieser den Zellzyklus bremsende Mechanismus kann auf dreierlei Weise mit gleichen funktionellen Auswirkungen gestört sein: Die homozygote Deletionen der *p15/p16*-Gene (*INK4b/a*), die Methylierung des *INK4a/b*-Promotors und die Punktmutation in der p15/p16-bindenden Domäne von CDK4. Sie verursachen durch Wegfall der CDK-Repression eine permanent hohe Konzentration des phosphorylierten Retinoblastomproteins (pRB) und somit eine verstärkte Zellproliferation. Mit molekularbiologischen Methoden wurden Leukämiezellen von Kindern mit ALL-Rezidiv in Bezug auf Deletionen von *INK4a* und *INK4b*, den Methylierungsstatus des *INK4a/b*-Promotors sowie auf Punktmutationen und andere genetische Aberrationen in der CDKI-Bindungsdomäne von *CDK4* analysiert. Damit wurden alle bisher bekannten Inaktivierungsmöglichkeiten dieses Teils des Zellzyklus erfasst und ihre Signifikanz für Therapie und Prognose von Kindern mit ALL-Rezidiv analysiert. Neben der hohen Prävalenz von Veränderungen in diesem Zellzyklusabschnitt und deren Korrelation mit T-Zellphänotyp und hohen Leukozytenzahlen beim ALL-Rezidiv fanden wir eine signifikante Assoziation zwischen *INK4*-Deletion und ungünstigsten prognostischen Parametern.

Projekt 5, Abschnitt 3.5 – Zytokine und Zytokinrezeptoren bei ALL

Differenzierung und Proliferation der unbestimmten hämatopoetischen Vorläuferzellen werden normalerweise durch die kontrollierte Expression von Transkriptionsfaktoren (s. Abschnitt 2.3), durch die zellulären Interaktionen im Knochenmarkmilieu und durch die Signalvermittlung durch Zytokine gesteuert.³⁵ Die Wachstumsfaktorproduktion und die aberrante Sensitivität gegenüber verschiedenen Zytokinen könnten andererseits die Proliferation und das Überleben der Leukämiezellen beeinflussen und zur massiven Expansion von Leukämiezellen beitragen. Für den Prozeß der Leukämieentwicklung sind die Zytokine auch aufgrund eines anderen Aspektes von Interesse. Sie stellen einen Einflußfaktor in der Organisation der immunologischen Tumorzellabwehr dar. Dieses kann sowohl die Generierung anti-Tumorreaktiver, mononukleärer Zellen als auch das Ausbleiben einer effektiven Immunantwort beinhalten.

Besonders bei den ALL-Rezidiven im Kindesalter mit deutlich verminderten Response- und Überlebensraten trotz intensivierter Therapie fehlen Erkenntnisse, die die aggressivere Biologie der Erkrankung zu erklären vermögen. Als effektiver intra- und extrazelluläre Signalmechanismus ist zu postulieren, dass den durch Zytokine über ihren Rezeptor bewirkten Impulsen eine besondere Bedeutung in der Proliferation und dem Überleben von Leukämiezellen sowie der Abwehr von Leukämien zukommt. Durch systematische molekulargenetische, zellbiologische und durchflußzytometrische Untersuchungen der Zytokin / Zytokinrezeptorexpression in/auf Leukämiezellen von Kindern mit ALL wurden in diesem Projekt Informationen darüber gewonnen, ob diese bzw. deren veränderte Expressionsmuster als Faktoren innerhalb des Prozesses der malignen Transformation lymphatischer Zellen in Frage kommen und/oder an der Entstehung immunologischer Regulationsstörungen im Rahmen der Leukämieentwicklung beteiligt sind. Bei einigen Zytokinen und Zytokinrezeptoren konnten wir neue alternativ gespleißte mRNA-Varianten identifizieren und charakterisieren. Über die Expression solcher alternativ gespleißten Transkripte ist eine Regulation der Proteinexpression auf posttranskriptioneller Ebene möglich. Zusammenhänge mit der Differenzierung, unterschiedlichen Aktivierungszuständen der Zelle oder der Zellart werden vermutet, in vielen Fällen ist jedoch noch nicht geklärt, welche Bedeutung den von den *splice*-Varianten kodierten Proteinisoformen *in vivo* zukommt.

Projekt 6, Abschnitt 3.6 – Hereditäre Polymorphismen von Zytostatika-metabolisierenden Enzymsystemen bei Kindern mit ALL-Rezidiv

Genetisch-determinierte Varianten Fremdstoff-metabolisierender Enzymsysteme sind nicht nur prädisponierende Faktoren der Entstehung von Neoplasien, sondern sind wegen der unterschiedlichen Aktivitäten der kodierten Enzyme für die Toxizität und die Detoxifizierung von Zytostatika mitverantwortlich und beeinflussen somit deren Effektivität. Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP, *single nucleotide polymorphism*) können die katalytische Aktivität dieser Enzymsystem und damit auch die Metabolisierung und Toxizität von Medikamenten eingreifend verändern.

In diesem Forschungsprojekt haben wir hereditäre Polymorphismen von Zytostatika-metabolisierenden Enzymen an einer großen Anzahl an KM-Proben von Kindern mit 1. ALL-Rezidiv untersucht, die entsprechend den Therapiestudien ALL-REZ BFM behandelt wurden. Unsere Ergebnisse geben signifikante Hinweise, dass nicht nur die Leukämogenese sondern vor allem auch die Therapie und Prognose eines Kindes mit ALL-Rezidiv von hereditären Parametern der Zytostatika-metabolisierenden Enzymen abhängen könnten. Diese Erkenntnisse sind sowohl für Metabolisierungsenzyme der Phase I (CYP1A1) als auch der Phase II (GSTT1, GSTP1) signifikant. In Abhängigkeit der Allelkonstellation ist anzunehmen, dass diese Enzymsysteme die Wirksamkeit und Toxizität der Chemotherapie bei Kindern mit ALL-Rezidiv synergistisch beeinflussen: Eine gute Aktivierung und schlechte Deaktivierung kann bei besserer anti-neoplastischer Medikamentenwirkung auch deren Toxizität erhöhen. Andererseits wird die therapeutische Effektivität durch eine schlechte Aktivierung bzw. gute Deaktivierung bei geringerer Toxizität vermindert. Somit ist anzunehmen, dass die genetische Disposition einen nicht unwesentlichen Einfluss auf die Effektivität einer Therapie hat.

Eine große Anzahl primärer genetischer Merkmale von pädiatrischen Neoplasien kann in eine von drei Kategorien eingeordnet werden: 1. Aktivierung von Protoonkogenen (durch Genamplifikation oder –rekombination), 2. Verlust der Funktion von Tumorsuppressorgenen (TSG) (durch Deletionen oder Inaktivierung), 3. Bildung von neuen Fusionsproteinen (durch chromosomale Translokationen). Prinzipiell sind zwei molekulare Mechanismen der Genfusion bei chromosomalen Translokationen möglich, die zur Veränderung der Genfunktion führen: 1. Die inadäquate Expression von Onkogenen durch das Zusammenkoppeln mit starken Enhancern/Promotoren (Fusion von Regulatorsequenzen eines Gens mit der gesamten kodierenden Sequenz des anderen) und 2. die Bildung von wirklichen Fusionsproteinen (Fusion

innerhalb der kodierenden Sequenzen beider Gene). Der Bruch und die Wiedervereinigung von DNA-Strängen führen zur Bildung eines chimären oder Fusionsproteins mit veränderter Funktion.

Primäre und sekundäre genetische Veränderungen sind in den meisten Leukämiezellen bei ALL nachweisbar. Diese sind eng mit der Pathogenese und dem klinischen Verlauf einschließlich des Ansprechens auf die Therapie und der Langzeitheilung assoziiert. In den nächsten Abschnitten werden bisherige Erkenntnisse über Faktoren, die die normale Differenzierung lymphatischer Zellen steuern und bei Leukämien verändert sind, und generelle pathogenetische Prinzipien von malignen Erkrankungen im Kindesalter, die potentielle Ziele einer spezifischen Therapie darstellen, zusammengefasst.

2.3 HÄMATOPOESE UND GENETISCHE VERÄNDERUNGEN BEI ALL

Somatisch erworbene genetische Aberrationen sind neben prädisponierenden Faktoren ursächlich für die Pathogenese von Leukämien verantwortlich. Durch diese Veränderungen erwerben Zellen verschiedene funktionelle Fähigkeiten, die mit einer erhöhten Proliferations-/Wachstumsrate (Störung der Zellzykluskontrolle, der Zellteilung), einem Differenzierungsblock und/oder einer Beeinträchtigung der Apoptose einhergehen.¹ Im Laufe der Zeit kann es dabei zu einer Akkumulation einzelner somatischer Mutationen kommen, die wahrscheinlich für die Zunahme maligner Erkrankungen mit dem Alter verantwortlich sind. Alternativ kann der maligne Phänotyp von einem oder von wenigen ausschlaggebenden genetischen Ereignissen herrühren, die multifunktionelle Auswirkungen haben, wie zum Beispiel Mutationen oder Genrekombinationen von Transkriptionsfaktor- (TF-) Genen, die sehr häufig bei Neoplasien im Kindesalter nachweisbar sind (Tabelle 3).³⁶

Besonders die Identifizierung der an rekurrenten chromosomalen Translokationen beteiligten Gene hat zur Aufklärung verschiedener Pathomechanismen der Leukämogenese und damit der normalen zellulären Differenzierung beigetragen. Es konnte gezeigt werden, dass die von den involvierten Genen kodierten Proteine Schlüsselrollen im normalen zell- und gewebespezifischen Differenzierungsprogramm spielen. Im Falle von Neoplasien im Kindesalter sind

¹ In einem mehrstufigen Prozess der Tumorgenese erlangen Zellen bei praktisch allen malignen Erkrankungen die gleichen Fähigkeiten. Diese umfassen die Autonomie von Wachstumssignalen, die Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Impulsen, die Beeinträchtigung der Apoptose, ein uneingeschränktes Replikationspotential, die Angiogenese, die Invasion von Gewebe und Metastasierung.

an der Bildung von Fusionsproteinen sehr häufig Transkriptionsfaktoren beteiligt, die durch die Fusion eine eingreifende funktionelle Veränderung der Transkriptionskontrolle erfahren.³⁶⁻³⁸ Prinzipielle Mechanismen funktioneller Genveränderungen in Leukämien und in soliden Tumoren im Kindesalter sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Primäre, charakteristische genetische Aberrationen bei Neoplasien im Kindesalter

Mechanismus	Translokation/ Genlokalisierung	Beteiligte Gene	Neoplasie
Onkogen-Aktivierung			
Überexpression des normalen Gens			
Translokation	t(8;14)(q24;q32) t(10;14)(q24;11)	<i>c-myc</i> <i>Hox11</i>	B-ALL, Burkitt-Lymphom T-ALL
DNA-Amplifikation	2p24	<i>n-myc</i>	Neuroblastom
Bildung eines Fusionsgens			
Transkriptionelle Repression	t(12;21)(p13;q22) t(1;19)(q23;p13) t(8;21)(q22;q22) inv(16)(p13;q22)	<i>TEL-AML1</i> <i>E2A-PBX1</i> <i>AML1-ETO</i> <i>CBFβ-MYH11</i>	B-Vorläuferzell-ALL prä-B-ALL AML (FAB M2) AML (FAB M4Eo)
Transkriptionelle Aktivierung	t(15;17)(q22;q21) t(2;13)(q35;q14) t(1;13)(p36;q14)	<i>PML-RARα</i> <i>PAX3-FKHR</i> <i>PAX7-FKHR</i>	AML (FAB M3) Rhabdomyosarkom, alveol. Rhabdomyosarkom, alveol.
Transkriptionelle Dysregulation	t(11;22)(q24;q12) t(21;22)(q12;q24) t(7;22)(p12;q12) t(11;22)(q13;q12) t(12;22)(q13;q12) t(X;18)(p11;q11) 11q23	<i>EWS-FLI1</i> <i>EWS-ERG</i> <i>EWS-ETV1</i> <i>EWS-WT1</i> <i>EWS-ATF1</i> <i>SYT-SSX1/2</i> <i>MLL-Fusionen</i>	Ewing-Sarkom/PNET Ewing-Sarkom/PNET Ewing-Sarkom/PNET Desmoplastom Klarzellsarkom Synovialsarkom ALL, AML
Veränderte Signaltransduktion	t(9;22)(q34;q11) t(5;12)(q34;p13) t(9;12)(q33;p13)	<i>BCR-ABL</i> <i>TEL-ABL</i> <i>TEL-PDGFRβ</i>	ALL, CML ALL JMML
Veränderte Phosphorylierung	t(2;5)(p23;q35)	<i>NPM-ALK</i>	Anaplastisches großzell. Lymphom
Dominant negative Mutation	11q13	<i>WT1</i>	Nephroblastom
Ektopische Expression	17q21 2q35/1p36 9q13 2q12	<i>HER2 (ERBB2)</i> <i>PAX3/7</i> <i>PAX5</i> <i>PAX8</i>	Osteosarkom Rhabdomyosarkom, emb. Glioblastom Nephroblastom
Verlust eines Tumorsuppressorgens	13q14 17p13 11q13 17q11 22q12 9q21 9q21	<i>RB1</i> <i>P53</i> <i>WT1/2</i> <i>NF1</i> <i>NF2</i> <i>P19ARF</i> <i>INK4A/B</i>	Retinoblastom Li-Fraumeni-Syndrom Nephroblastom Neurofibrosarkom Meningiom Verschiedene Neoplasien Verschiedene Neoplasien

Die Bedeutung der Transkriptionsfaktoren für die geordnete hämatopoetische und lymphatische Zelldifferenzierung wird im folgenden Abschnitt erläutert.

2.3.1 Differenzierung und Reifung lymphatischer Zellreihen

Das hämatopoetische System regeneriert kontinuierlich alle Zellreihen des Blutes während des gesamten Lebens. Dieser andauernde Prozess schließt die Differenzierung der hämatopoetischen Stammzelle (HSC; *hematopoietic stem cell*) in Progenitorzellen ein, die eine Bestimmung in eine der Zellreihen erfahren und sich in reife Zellen weiter entwickeln.³⁹ Die Differenzierung und Reifung von B-, T-Lymphozyten und NK-Zellen (natürliche Killerzellen) aus HSC erfolgt in sich überlappenden zellulären Spezifizierungs- und Bestimmungsschritten. Sie verläuft über eine gemeinsame lymphatische Progenitorzelle, aus der die Vorläuferzellen (*precursor*) für die verschiedenen Zellreihen entstehen.

Der Übergang von den pluripotenten HSC in die Progenitor- und daraufhin ausgereiften Zellen geht verallgemeinert mit der Herunterregulation von Stammzellgenen und der Aktivierung von zellreihenbeschränkten Genen einher. Diese werden in einem interaktiven Prozess durch multiple Transkriptionsfaktoren, Zytokinrezeptoren und Signaltransduktionsmolekülen streng reguliert.⁴⁰⁻⁵⁵ Nach heutiger Kenntnis wird die hämatopoetische Zelltypwahl und Differenzierung durch die Wirkung von dominanten Hauptregulatoren (Haupttranskriptionsfaktoren) in Kooperation mit anderen, häufig zelltypbeschränkten, Faktoren reguliert (positive Regulation). Die von ihnen simultan bewirkte Repression des Genprogramms der anderen Zellreihen unterdrückt deren Entwicklung (negative Regulation; Antagonismus).

Während diese Haupttranskriptionsfaktoren somit die Determinierung eines bestimmten Zellphänotyps vermitteln, bewirken sie parallel, dass das Genprogramm der jeweils anderen Zelllinie (Kreuzantagonismus) aktiv unterdrückt wird.⁵³⁻⁵⁵ Diese Kreuzregulation der Schlüsselfaktoren wird sowohl durch Protein-Protein-Interaktionen als auch auf dem transkriptionellen Niveau bewirkt. Zusätzlich wird über die alleinige An- oder Abwesenheit eines TF hinaus die Zelltypwahl und Differenzierung durch dessen Konzentration beeinflusst. Diese Effekte spiegeln möglicherweise konzentrationsabhängige Regulierungen der Zielgene und/oder die Empfindlichkeit der Proteinkomplexe wieder, die für das transkriptionelle Programm kritisch sind. Die Expression dieser frühen zelltyp- und differenzierungsbestimmenden TF wird durch negative Rückkopplung und durch TF der terminalen Differenzierung wiederum unterdrückt. Das eingeleitete zelluläre Differenzierungsprogramm bewirkt somit eine sukzessive, unumkehrbare Einschränkung des Potentials der Zellen, in andere Zellreihen zu differenzieren, und eine zunehmende funktionelle Reifung.

Regulatorische Schlüsselmoleküle der Hämatopoese sind bezüglich ihrer Expression üblicherweise nicht zelltypspezifisch. Sie werden von unterschiedlichen Zelltypen geteilt.^{39,41,53,54,56-58} Dies bedeutet, dass eine Kombination von Faktoren zur Bestimmung der Zellreihe benötigt wird. Weiterhin gehören viele regulatorische Schlüsselmoleküle zu Multigenfamilien. Deren Mitglieder weisen überlappende Expressionsmuster und zumindest eine geringe Fähigkeit auf, dasselbe Zielgen zu regulieren. Somit werden mitunter auch bei Wegfall eines bestimmten TF determinierte Zellen gefunden.^{39,53,54,56,57} Zuletzt wird die Gesamtmenge an verschiedenen hämatopoetischen Zelltypen durch zellreihenspezifische Proliferations- und Überlebenssignale bestimmt, die durch Zytokine und durch Zell-Zell-Interaktionen kontrolliert werden. Das terminale Differenzierungsprogramm jeder Blutzelle beinhaltet zellreihenspezifische Proliferationskontrollen, wodurch die produzierte Zellzahl von der Interaktion mit Zytokinen abhängt. Entsprechend kommt der Expression der Gene, die für zellreihenspezifische Zytokinrezeptoren kodieren, eine wichtige Bedeutung bei der differenzierungsassoziierten Genexpression jedes Zelltyps zu. Diese Eigenschaften des hämatopoetischen Entwicklungssystems zeigen, dass die hämatopoetischen Zelltypen nicht durch den dominanten Einfluss eines einzelnen TF sondern durch die selektive Aktivierung eines bestimmten Satzes an Genen, deren Proteinprodukte gleichzeitig die Differenzierung in eine andere Zellreihe reprimieren, in einem großen regulatorischen Transkriptionsnetzwerk entstehen.

Die Gene, die für die normale Hämatopoese notwendig sind, sind bei Leukämien häufig rekombiniert bzw. können in Mäusen bei falscher Expression oder funktioneller Störung eine Leukämie auslösen. Mehr als die Hälfte aller bisher identifizierten hämatopoetischen TF sind durch die Beteiligung ihrer Gene an chromosomalen Translokationen oder durch funktionelle Expressionsanalysen in der Maus entdeckt worden (s. Abbildung 2).

2.3.2 B-Zellspezifizierung und –bestimmung

Für die Entwicklung der hämatopoetischen Stammzellen aus dem Mesoderm werden den Transkriptionsfaktoren SCL, LMO2, GATA-2 und AML1 entscheidende Funktionen zugeschrieben. Die Aufrechterhaltung der HSC-Funktion wird hingegen durch die Faktoren TEL und MLL erfüllt (s. Abbildung 1). Die weitere Entwicklung und Zellreihenfestlegung lymphatischer und myeloischer Vorläuferzellen aus multipotenten HSC wird wesentlich von den Transkriptionsfaktoren GATA-2/3, PU.1, Ikaros und c-myb, von interzellulären Interaktionen (*microenvironment*) und Wachstumsfaktoren reguliert.^{39,53,54} Aus der IL-7-Rezeptor-

positiven (IL-7R⁺) lymphatischen Stammzelle entwickeln sich alle Lymphozyten (B-, T-, NK-Zellen),⁵⁹ während myeloische Zellarten aus der IL-7R⁻ myeloischen Stammzelle hervorgehen.⁵² PU.1 reguliert die zytokinabhängige Proliferation und Differenzierung der myeloischen und lymphatischen Progenitorzellen durch Kontrolle der Expression der entsprechenden Zytokinrezeptoren,^{50,60} wobei die Stärke der PU.1-Expression das lymphatische oder myeloische Schicksal früher Progenitorzellen bestimmt (in Abhängigkeit von der IL-7-Empfindlichkeit).^{49,61}

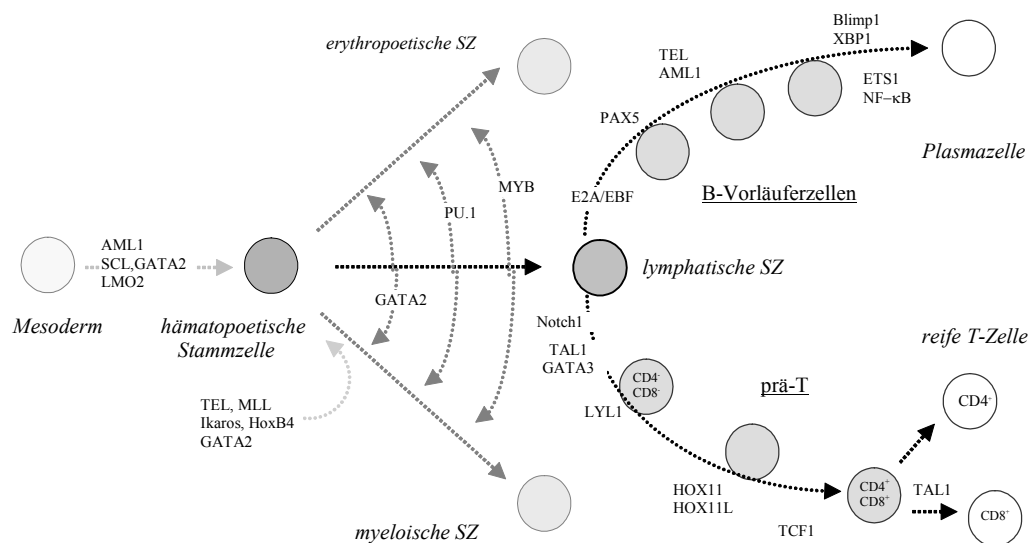


Abbildung 1: Transkriptionsfaktoren und Regulierung der Hämatopoese

Bei Veränderungen des Transkriptionsfaktors PAX5 hingegen bleibt die B-Zellentwicklung auf der etwas differenzierteren pro-B-Stufe stehen.^{58,62} PAX5 wird im Gegensatz zu E2A/EBF nicht für die B-Zellreihenspezifizierung benötigt. Eine Funktion von PAX5 ist, zusammen mit einer intakten IL-7R-Signalgebung, die Initiierung der Genrekombination der V_H-Segmente der schweren Ig-Kette.^{58,62} PAX5^{-/-}-pro-B-Zellen behalten die Fähigkeit, in verschiedene myeloische, T- und NK-Zellen zu differenzieren.^{58,63-65} Neben diesen multipotenten Eigenschaften besitzen PAX5^{-/-}-pro-B-Zellen ein extensives *in vivo* Selbsterneuerungs- und Rekonstitutionspotential.⁶⁶ Folglich verhindert PAX5 die non-B-Zellentwicklung durch Repression von non-B-Zellreihengenen (MPO, M-CSF-R) und Aktivierung von B-zellspezifischen Genen (BLNK, CD19, Igα; V_H-D_HJ_H-Rekombination).^{55,58,62} PAX5 stellt damit den kritischen Bestimmungsfaktor dar, der die Entwicklungsoptionen von lymphatischen Progenitorzellen auf die B-Zelllinie einschränkt. Neben der bereits erwähnten IL-7-Signalgebung sind Überle-

ben und Proliferation von pro-B-Zellen von der mitogenen WNT-Signalgebung abhängig.⁶⁷⁻⁶⁹ TGF- β ist hingegen ein potenter Wachstumsinhibitor von Lymphozyten.^{70,71} Es induziert die Expression des HLH-Transkriptionsfaktors Id3. Durch Störung der DNA-bindenden Aktivität des B-Zell-spezifischen Faktors E2A wird von Id3 die B-Zellentwicklung angehalten.⁷¹ In der terminalen Differenzierung der Plasmazelle werden die Transkriptionsfaktoren Blimp1 und XBP1 (*X-binding protein 1*) induziert.⁷²⁻⁷⁶ Diese löschen wiederum die Expression einer Vielzahl von lymphatischen TF einschließlich der genannten E2A, EBF, PAX5, PU.1 sowie von Sox4, Spi-B, Oct2, STAT6, Ikaros und Bcl-6 aus.^{72,75-77} Die bisher bekannte Funktion und Einordnung von TEL und AML1 in der hämatopoetischen Entwicklung sowie die Auswirkung ihres funktionellen Ausfalls wird im Abschnitt 3.1 (Projekt 1) ausgeführt.

2.3.3 T-Zellspezifizierung und -bestimmung

Der Prozess der Zellreihenfestlegung von T-Zellvorläufern scheint komplexer zu sein und Äquivalente programmdefinierende Netzwerkregulatoren wie bei B-Zellen sind noch nicht bekannt.^{57,78-80} Durch den Verlust eines der kooperierenden Faktoren Notch1, c-myb, Ikaros, PU.1 oder GATA-3 wird die T-Zellreihenwahl einschneidend gestört.^{54,57,78,81-83} Bevor der Initiierung der Rekombination der V(D)J-Gensegmente der T-Zellrezeptoren (TZR- $\gamma\delta$ oder - $\alpha\beta$) exprimieren die Zellen kurzfristig IL-7R α sowie Rag1/2-Komponenten.^{53,57}

Die Signalübertragung über Notch-Rezeptoren spielt eine entscheidende Schlüsselrolle sowohl in der T-Zellentwicklung als auch der T- versus B-Zellreihendeterminierung.^{54,57,82,83} Eine wichtige Funktion von Notch in der T-Zellspezifizierung ist dabei die Suppression der B-Zell-Lymphopoese.⁸⁴ Es stört selektiv die Aktivität von E2A, das zur B-Zellentwicklung benötigt wird.^{83,85} Bei Notch-Verlust (in *knockout*-Mäusen) ist die T-Zelldifferenzierung stark beeinträchtigt (nach dem CD4⁺ CD8⁻ Stadium).^{86,87} Die durch Notch-Verlust gestörte T-Zellentwicklung geht mit einer ektopten Differenzierung in pro-B-Zellen im Thymus einher. Weiterhin sind LYL1, HOX11/L2 und TAL für die kontrollierte T-Zelldifferenzierung von Bedeutung (s. Abbildung 1).

2.4 TRANSLOKATIONSLEUKÄMIEN UND FUSIONSGENE

2.4.1 Chromosomale Translokationen

Ein bei der Aufklärung von chromosomalen Translokationsbruchpunkte bei Leukämien unerwartetes Ergebnis war, dass die Gene, die für die normale Hämatopoese essentiell sind, identisch mit denen sind, die in Leukämien verändert sind. Basierend auf den funktionellen Eigenschaften der an der Fusion beteiligter Gene lässt sich ein Netzwerk aufstellen, an dem nur eine beschränkte Anzahl an pathogenetisch bedeutsamen Genen beteiligt ist. Dies bedeutet umgekehrt jedoch auch, dass die Anzahl der Signaltransduktionswege und Entwicklungsschritte, die in der Leukämogenese verändert sind, ebenfalls sehr limitiert ist. Zusätzlich sind nur wenige Gene, die zentrale Knotenpunkte in diesem Netzwerk bilden, an mehr als einer Translokation beteiligt. Bei akuten Leukämien sind dies vor allem *TEL*, *AML1* und *MLL*, und in geringerem Maße *BCR*, *ABL*, *PDGFRβ*, *JAK2*, *CBP*, *AF10*, *MDS1-EV11* und *ZNF220* (s. Abbildung 1).

Die aus diesen Translokationen resultierenden chimären Fusionsproteinen wirken in einigen Fällen dominant-negativ, blockieren die Wirkung ihres normalen Gegenstücks und entscheidender zellreihendeterminierender Faktoren.^{36,38} Zum Beispiel stören die Fusionsproteine TEL-AML1 [t(12;21)], AML1-ETO [t(8;21)] oder PML-RARα [t(15;17)] die normale hämatopoetische Differenzierung. Die Wirkung der genannten Fusionsproteine als dominant-negative Inhibitoren der Transkription wird durch Rekrutierung des nukleären Kopressorkomplexes (NCoR, Sin3) und von Histondeacetylasen (HDAC) vermittelt (s. Abschnitt 2.4.3).⁸⁸ Funktionell können die an Translokationen bei ALL beteiligten, wichtigen Steuerungselemente in Transkriptionsfaktoren (TEL, AML1, E2A), Tyrosinkinasen (ABL, PDGFRβ, JAK2) und Koaktivatoren oder Chromatinkontrolleure (ZNF220, CBP, MLL) grob eingeteilt werden (s. Abbildung 2).

Wenige Mutationen sind für sich allein fähig, eine Leukämie auszulösen. Zum Beispiel hemmen die Fusionsproteine TEL-AML1, E2A-PBX1, AML1-ETO, MLL-AF4 und PML-RARα zwar die hämatopoetische Entwicklung, vermögen jedoch meist nicht eigenständig eine Leukämie auszulösen. Dies gilt ebenfalls für aktiviertes Ras-Protoonkogen, oder aktivierte Zytokinrezeptoren (z.B. FLT3). Diese experimentellen und epidemiologischen Erkenntnisse lassen ein mehrstufiges Modell der Leukämogenese vermuten, in dem Leukämien durch das gemeinsame Wirken zweier Klassen von Mutationen entstehen. Die *erste* Mutationsklasse bewirkt

einen *Proliferations- und/oder Überlebensvorteil* der hämatopoetischen Vorläuferzellen, hat jedoch keinen Einfluss auf die Differenzierung. Beispiele dieser Klasse sind konstitutiv aktivierte Tyrosinkinasen oder nachgeschalteter Effektoren (Zytokine, Zytokinrezeptoren, RAS, Veränderungen der Zellzykluskontrollgene, BCR-ABL, TEL-PDGFR β). Die *zweite* Mutationsklasse *verhindert die hämatopoetische Differenzierung*, wodurch eventuell ein Überlebensvorteil durch Störung der terminalen Differenzierung und der Apoptose entsteht. Beispiele sind z.B. Fusionsproteine (TEL-AML1, E2A-PBX1, AML1-ETO, PML-RAR α) oder CBF-Mutationen. Beide Mutationsklassen werden zur Ausprägung des Phänotyps bei akuten Leukämien benötigt, der durch eine erhöhte Proliferation und verlängertes Überleben bei gleichzeitig gehinderter hämatopoetischer Differenzierung gekennzeichnet ist. Die Konsequenz dieser hypothetischen Überlegung ist, dass möglicherweise ein therapeutischer Synergismus zu erreichen wäre, wenn beide Mutationsklassen durch den Einsatz entsprechender Substanzen gezielt beeinflusst werden.

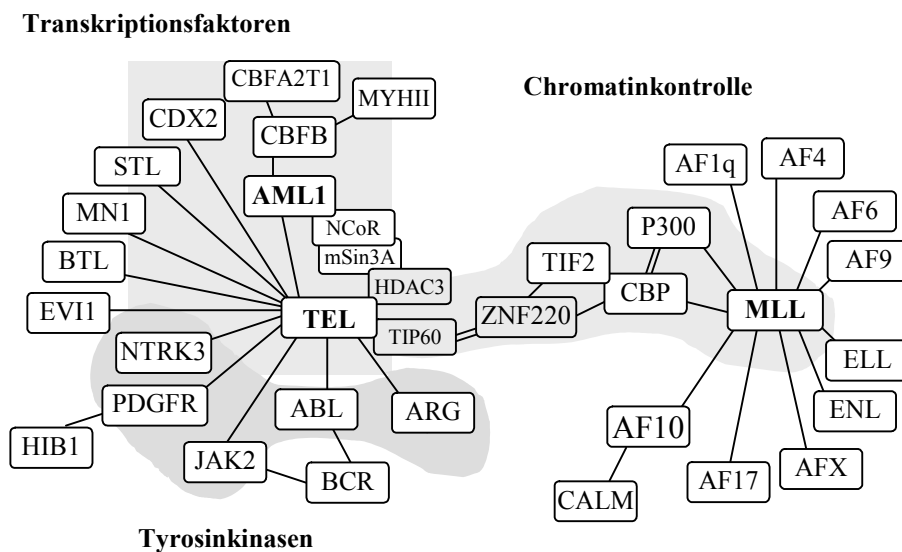


Abbildung 2: Fusionsgennetz bei Leukämien mit *TEL*- und *AML1*-Beteiligung

2.4.2 Prognose

Während klinische Parameter zur Einschätzung des Rezidivrisikos und zur Therapiestratifizierung nützlich sind, fehlt ihnen jedoch der benötigte prädiktive Wert für den einzelnen Patienten mit einer ALL. Die molekulare Charakterisierung spezifischer Veränderungen in den einzelnen Leukämiesubgruppen liefert wichtige Informationen, die möglicherweise zukünftig eine individuelle leukämiespezifische Therapie ermöglichen könnten.

Ein Beispiel sind die Säuglingsleukämien, bei denen der Heilungserfolg am besten durch molekulargenetische Analysen (Vorhandensein/Abwesenheit der aus der chromosomalen Translokation t(4;11) resultierenden Genfusion *MLL-AF4*⁺) vorausgesagt werden kann.⁸⁹ Die prognostische Signifikanz der genetischen Analyse wird ebenfalls bei *BCR-ABL* Positivität (chromosomale Translokation t(9;22)) deutlich. Beide molekulargenetischen Veränderungen haben einen entscheidenden Effekt auf die Zellproliferation und –reifung. Sie definieren ALL-Subgruppen bei der Ersterkrankung und beim Erstrezidiv, die ein schlechtes Ansprechen auf die Chemotherapie zeigen und eine insgesamt schlechte Prognose haben (s. Projekt 1, Abschnitt 3.1).^{31,90} Entsprechend sollte bedacht werden, ob die einheitliche Behandlung aller Säuglinge mit ALL nach einem Protokoll (*Interfant*) aufgrund der unterschiedlichen genetischen Aberrationen in den Leukämiezellen gerechtfertigt ist. Bei diesen Leukämien ist es sehr wahrscheinlich, dass die Ineffektivität der Chemotherapie die biologischen Alterationen in der Leukämiezelle direkt widerspiegelt. Andererseits haben Patienten mit hyperdiploider (>50 Chromosomen) oder *TEL-AML1*⁺ ALL (chromosomale Translokation t(12;21)) ein gutes Ansprechen auf die Chemotherapie und eine bessere Prognose bei Ersterkrankung und beim Rezidiv (s. Projekt 1, Abschnitt 3.1).^{27-29,91,92} Die Heterogenität der Leukämien wird besonders eindrucksvoll durch die genomweiten Genexpressionsanalysen mittels der *microarray*-Technologie deutlich.⁹³⁻⁹⁵ Einzelne Translokationsleukämien lassen sich anhand ihres Expressionsmusters bereits erkennen. Der prognostische und therapeutische Nutzen dieser Technik muss noch evaluiert werden.

2.4.3 Molekulare Ziele

Zusätzlich zur Bedeutung des Nachweises von Fusionsgenen/-transkripten in der Voraussage des Therapieerfolgs ist davon auszugehen, dass die daraus resultierenden chimären Proteinprodukte, die mit ihnen interagierenden Proteine oder von ihnen bedingte Veränderungen zukünftig eine wichtige Rolle als spezifische Ziele in der Therapie molekular-definierter

ALL-Subgruppen spielen. Als Beispiele und Modell seien die Therapieansätze mit all-trans-Retinsäure (ATRA)⁹⁶⁻⁹⁸ und Arsenitrioxid^{99,100} bei *PML-RARα*⁺ APL (akute Promyelozyten-Leukämie), in der ein Fusionsprotein gebildet wird, an dem der Retinsäurerezeptor- α beteiligt ist, und seit kurzem die klinische Erprobung von STI571 (*Gleevec*), einem cABL-Tyrosinkinase-Inhibitor (mit Wirksamkeit gegen PDGF-R und c-kit), bei *BCR-ABL*⁺ Leukämien genannt.¹⁰¹⁻¹⁰³ Das Fusionsprotein PML-RAR α wirkt als dominant-negativer Transkriptioninhibitor durch die aberrante Rekrutierung des nukleären Korepressorkomplexes (NCoR-mSin3/SMRT) und von Histondeacetylasen (HDAC). Diese Rekrutierung bewirkt eine Deacetylierung der Histone und Remodulierung der Chromatinstruktur (Kondensierung) mit resultierender Transkriptioninhibition. *PML-RARα*⁺ APL-Zellen reagieren dramatisch auf den differenzierenden Effekt von ATRA.¹⁰⁴ Die Bindung von ATRA bewirkt die Freigabe von NCoR und die Wiederherstellung des normalen transkriptionellen Programms.²

Der klinische Erfolg der Differenzierungstherapie hat die Suche nach weiteren chemischen Substanzen angeregt, die den NCoR-Komplex einschließlich der Histondeacetylasen zum Ziel haben und die Transkriptioninhibition durch Histondeacetylasen oder durch DNA-Methyltransferasen aufheben.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ Die aberrante Rekrutierung des NCoR-/Histondeacetylase-Komplexes an Regulatoreinheiten eines Gens ist ein mittlerweile häufig beobachteter Mechanismus der Genabschaltung, der durch leukämiespezifische Fusionsproteine vermittelt wird. Beispiele sind die Fusionsproteine PML-RAR α (APL), AML1-ETO (AML) und TEL-AML1 (ALL; s. Abschnitt 2.4). Die anhaltende Interaktion von NCoR-mSin3-HDAC durch Fusionsproteine oder mutierten Proteinen an den regulatorischen Zielen der normalen Transkriptionsfaktoren bewirkt eine konstitutive transkriptionelle Repression und unterstützt die Leukämogenese. Vor kurzem sind weitere Verbindungen zwischen malignen Tumoren und HDAC beschrieben worden. Die Signalgebung durch mutiertes Ras oder durch die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase verändert die nukleäre oder zytoplasmatische Verteilung von gewissen HDAC-Proteinen, die Genexpressionsprofile und die Proliferation.¹⁰⁸

² Die Zellproliferation und -differenzierung werden durch Veränderungen der Genexpression gesteuert und benötigen die koordinierten Effekte der Transkriptionsmaschinerie und von chromatinremodulierenden Faktoren. Mutationen in chromatinmodifizierenden und -remodulierenden Proteinen können eine aberrante Regulation der Chromatinstruktur bewirken, die zur verkehrten Genexpression und zur Entstehung von malignen Tumoren führt. Zu den Faktoren, die die Übergänge der Chromatinstruktur steuern, gehören Histonacetylasen, HDAC und weitere ATP-abhängige Enzyme.

Maligne Tumore weisen fast immer Veränderungen der DNA-Methylierung auf. Diese Alteration stellt die häufigste Beziehung zwischen Neoplasie und Chromatin dar. Die methylierungsassoziierte Genabschaltung wird durch HDAC vermittelt (Interaktion von DNA-Methyltransferasen, mSin3-HDAC und CpG-bindenden Proteinen).¹⁰⁹ Eine Demethylierung methylierter Promotoren ist verbunden mit der Re-Expression der entsprechenden Gene sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene, welches prinzipiell neue Therapiestrategien denkbar erscheinen lässt.

2.4.4 Therapeutische Strategien

Die gegenwärtigen Protokolle zur Behandlung von Kindern mit ALL basieren auf den seit 30 Jahren empirisch gewonnenen Erfahrungen der Chemotherapie. Die zunehmende Fähigkeit genetische Veränderungen auf molekularer Ebene zu identifizieren, bietet einerseits die Möglichkeit einen genetischen Abdruck und die Mechanismen des neoplastischen Geschehens zu erkennen⁹² andererseits die Chance eines gezielten therapeutischen Eingreifens.^{88,101,105,106,110,111} Es ist wahrscheinlich, dass in Zukunft eine Verbesserung der Heilungsraten von malignen Erkrankungen durch die Verwendung von spezifischen Substanzen erreicht werden wird, die gegen spezifische molekulare Ziele gerichtet sind. Bekannte molekulare Ziele bei Leukämien, bei denen derzeit bereits eine gezielte therapeutische Interventionsmöglichkeit besteht, sind, wie oben beschrieben, das BCR-ABL Fusionsprotein, weitere Rezeptor- und Nonrezeptor-Tyrosinkinasen sowie häufig der NCoR/HDAC-Komplex bei Translokationsleukämien (s. Projekt 1, Abschnitt 3.1.2.3).

Es ist theoretisch möglich, die aberranten Promotormethylierungsmuster, welche außerdem mit einer Hypoacetylierung der Histonproteine und damit einer transkriptionell inaktiven Chromatinkonformation einhergehen, mittels Gabe von Substanzen aufzuheben, die entweder gegen die Methyltransferase (z.B. 5-Azacytidin oder neuere, experimentell wirksame inhibitorische Nukleinsäuren [DNAzyme oder RNAi]) bzw. gegen die Histondeacetylasen (z.B. Trichostatin A, Valproinsäure, synthetische Histondeacetylaseinhibitoren der neueren Generation) gerichtet sind.

Ebenfalls könnte die Entwicklung von immunologischen Therapiekonzepten bei den Translokationsleukämien Erfolg versprechend sein. Diese umfassen Immunstrategien mit bruch-

punktüberspannenden DNA-/ Peptidsequenzen zur Generierung von spezifischen Antileukämie-T-Zellklonen^{112,113} oder Ansätze mit therapeutischen Nukleinsäuren (Antisense, DNA-zymer, Ribozyme).¹¹⁴

Die Aufklärung weiterer pathogenetischer Mechanismen/Veränderungen könnte durch die modernen genomischen Techniken wie die DNA-*microarray* Genexpressions- (Transkriptom) und Proteomik-Strategie (Proteom) zur Identifizierung von neuen therapeutischen Angriffspunkten und von prognostischen Indikatoren erleichtert werden. Falls sich diese neuen molekular gesteuerten Therapieansätze als effektiv erweisen, muss jedoch damit gerechnet werden, dass sich andere Resistenzmechanismen gegen die eingesetzten Substanzen entwickeln werden. Erfolgreiche Lösungen dieser Probleme können nur durch die Kooperation von Grundlagenforschern und Klinikern sowie durch klinische Studien erreicht werden, die die Vorteile dieser neuen gezielten Therapie auswerten.

3 ZUSAMMENFASSUNG DER PUBLIZIERTEN FORSCHUNGSERGEBNISSE - WISSENSCHAFTLICHE PROJEKTE -

3.1 PROJEKT 1: FUSIONSGENE BEI ALL-REZIDIVEN IM KINDESALTER

3.1.1 Translokationsleukämien bei ALL-Rezidiven

Seit Mitte der siebziger Jahre konnten die Langzeit-Heilungschancen von Kindern mit initialer ALL durch risikoadaptierte Therapiestrategien mit kombinierter Radio-Polychemotherapie auf ca. 70 bis 75 % gesteigert werden. Diese Risikoadaptation basiert auf bestimmten prognostischen Faktoren, die als Kriterien zur Stratifizierung der Kinder mit ALL in entsprechende Behandlungszweige mit einer entweder reduzierten Toxizität der Chemotherapie (geringeres Risiko) oder mit einem intensiveren Therapieansatz (hohes Risiko) verwendet werden (s. Abschnitt 2.1.1.1).

Die Tatsache, dass trotz dieser intensiven, risikoadaptierten Induktions- und Postremissionstherapie ungefähr 20 - 30 % der Kinder mit ALL ein Rezidiv erleiden, macht es erforderlich, neben den bekannten klinischen nach weiteren biologischen Parametern zu suchen, um eine individuellere Therapie zu verwirklichen. Bis jetzt bekannte unabhängige klinische Prognosefaktoren, die im Zusammenhang mit dem Erreichen einer 2. kompletten Remission (*complete remission*, CR) und der Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens stehen, sind Zeitpunkt des Rezidivs nach Erstdiagnosestellung, T-Zell-Immunphänotyp und Lokalisation des Rezidivs (ALL-REZ BFM 83 - 96).^{18,19} Wir konnten zeigen, dass neben diesen klinischen Parametern das Vorhandensein eines bestimmten biologischen Merkmals in den Leukämiezellen beim ALL-Rezidiv, der Nachweis eines *BCR-ABL* Hybridgens (Translokation t(9;22)),^{31,32} oder eines *TEL-AML1* Fusionstranskripts (Translokation t(12;21))^{24-26,30} für die Prognose und damit der weiteren Therapieentscheidung und -gestaltung von entscheidender Bedeutung sein kann.

In den folgenden Abbildungen (Abbildung 3 und Abbildung 4) sind die Prävalenzen bestimmter Fusionsgene bei ALL-Ersterkrankung und die von uns ermittelten bei ALL-Erstrezidiven (eigene Daten; Therapieoptimierungsprüfung ALL-REZ BFM) wiedergegeben.

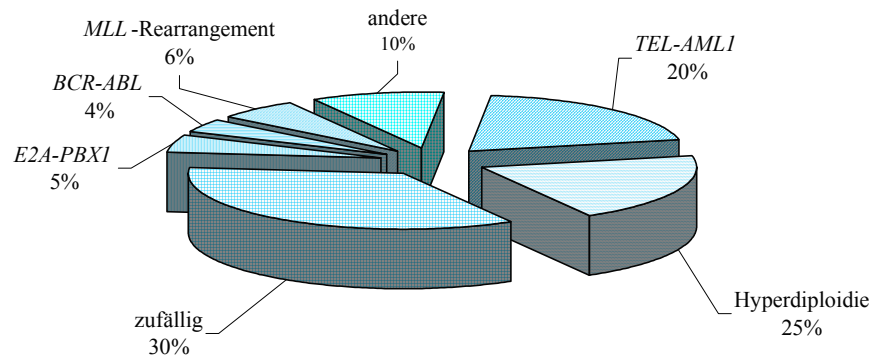


Abbildung 3: Prävalenz genetischer Veränderungen bei ALL-Ersterkrankung im Kindesalter³⁸

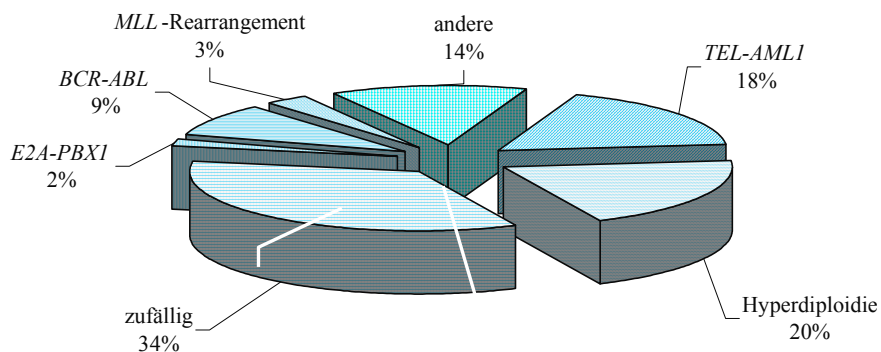


Abbildung 4: Prävalenz genetischer Veränderungen bei ALL-Erstrezidiv im Kindesalter (nicht veröffentlichte eigene Daten)

Im Gegensatz zu publizierten Daten,^{27-29,115} die keine bzw. nur eine geringe Rezidivrate bei *TEL-AML1* positiven ALL-Ersterkrankungen beobachteten, war die von uns bestimmte Inzidenz von *TEL-AML1* Positivität im Rezidivfall gleich hoch wie bei Ersterkrankung.²⁴ Dennoch wird durch dieses genetische Merkmal in beiden Leukämie-Erkrankungsstadien eine

Patientengruppe identifiziert, die mit gegenwärtigen Therapiekontrollen gute Heilungschancen haben. Diese Diskrepanz zwischen sehr guter Prognose bei Ersterkrankung und der hohen Inzidenz beim Rezidiv von *TEL-AML1* positiven ALL sowie die Unterschiede im klinischen Verlauf dieser ALL-Entität waren der Anlass verschiedener Projekte. In den folgenden Abschnitten sind die bisherigen Erkenntnisse über die Transkriptionsfaktoren TEL, AML1 und dem Fusionsprotein TEL-AML1 zusammengefasst.

3.1.2 *TEL-AML1* Fusion bei ALL

Die Gene für die Transkriptionsfaktoren TEL und AML1 gehören zu den am häufigsten von chromosomalen Translokationen bei humanen Leukämien betroffenen Genorten. Bei Leukämien der myeloischen und der lymphatischen Reihe finden sich die für *TEL* und *AML1* kodierenden Gene mit einer Vielzahl von Partnergenen fusioniert.^{116,117} Ungefähr 20 - 25 % der akuten lymphoblastischen B-Vorläuferzell- (BVZ) Leukämien des Kindesalters tragen eine kryptische, zytogenetisch nicht nachweisbare, Translokation t(12;21), durch die das Fusionsgen *TEL(ETV6)-AML1(CBFA2)* gebildet wird. Sowohl TEL als auch AML1 spielen als Transkriptionsfaktoren in der Hämatopoese eine essentielle Rolle.¹¹⁸⁻¹²⁰ AML1 wird insbesondere in der fetalen hepatischen Hämatopoese,¹¹⁹ TEL in der späteren Knochenmarkhämatopoese eine entscheidende Funktion zugeschrieben.¹¹⁸

3.1.2.1 Transkriptionsfaktor TEL

Das *TEL*-Gen gehört zur Familie der eukaryotischen ETS-Transkriptionsfaktoren und wird deshalb auch '*ETS- (E-twenty-six-specific) variant gene 6' (ETV6)* genannt. Bei Mäusen führt die homozygote *TEL*-Deletion zu einem substantiellen Defekt im sich entwickelnden Gefäßsystem des Dottersacks und zur embryonalen Letalität (d10.5). Weiterhin findet keine definitive Hämatopoese im Knochenmark statt, so dass angenommen werden kann, dass ein Defekt der Zellmigration oder Zelladhäsion von Stammzellen vorliegt. Die TEL-Überexpression in RAS-transformierten NIH3T3-Zellen führt zur Wachstumsinhibition und zur zellulären Aggregation, d.h. zur Veränderung der zellulären Morphologie.

Die Zielgene des ETS-Transkriptionsfaktors TEL (HLH/*pointed*- und ETS DNA-bindende Domäne) sind noch weitestgehend unbekannt. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass TEL ein Tumorsuppressor ist, der die transkriptionelle Expression verschiedener Gene unterdrückt. TEL inhibiert die Transkriptionsaktivierung durch das Fli1-Onkoprotein,¹²¹ unter-

drückt die Expression von Stromelysin-1 (Matrix-Metalloproteinase-3) und wirkt als sequenzspezifischer Repressor an EBS (ETS-binding-site) enthaltenden Promotoren. Matrix-Metalloproteinasen werden zur Zellmigration, Organisation der extrazellulären Membran und der Tumordinvasion sowie der Metastasierung benötigt. Neuere Publikationen veranschaulichen die repressorische Wirkungsweise von TEL auf dessen Zielgene. Die Korepressoren mSin3a und NCoR binden an der *pointed*- und der zentralen Repressionsdomäne von TEL. An dieser zentralen Region bindet ebenfalls die Histondeacetylase-3 (HDAC3).¹²²⁻¹²⁵ Bei TEL-Expression sind die Histone an den TEL-Bindungsstellen wenig acetyliert. Der Histondeacetylase-Inhibitor Trichostatin verhindert die TEL-abhängige Repression von Stromelysin und kehrt den TEL-induzierten, zellulären Aggregationsphänotyp (in NIH3T3-Zellen) um. Somit benötigt TEL die Histondeacetylase-Aktivität zur Veränderung der zellulären Morphologie. Die Rekrutierung von Histondeacetylasen an Promotoren führt zur Histondeacetylierung, wodurch die Chromatin-Kondensation verstärkt und die Promotoren für den Transkriptionskomplex weniger zugänglich sind.

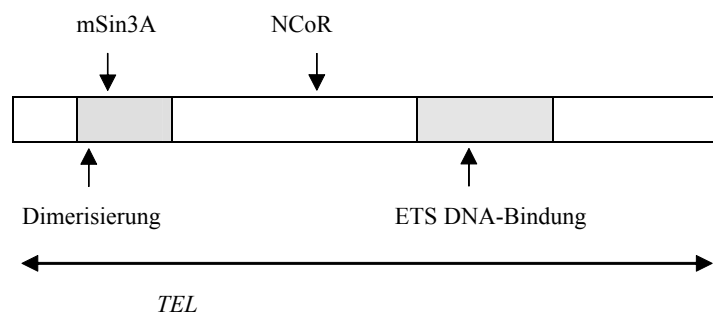


Abbildung 5: Schematische Darstellung des TF TEL mit HLH/PNT-Dimerisierungs- und DNA-Bindungsdomänen sowie Korepressorinteraktionsregionen

Einen ähnlichen Mechanismus der transkriptionellen Repression, wie bei TEL beschrieben, weist eine bekannte Tumorsuppressorgruppe auf. Das Retinoblastomprotein reguliert den Übergang der G₁/S-Phase im Zellzyklus durch Bindung von HDAC-1 und E2F (s. Abschnitt 3.3). Der p53-Tumorsuppressor bindet ebenfalls mSin3a-Korepressoren zur Transkriptionsrepression.¹²⁶⁻¹²⁸ Diese p53-vermittelte Repression scheint für die Induktion der Apoptose notwendig zu sein.

3.1.2.2 Transkriptionsfaktor AML1

Wie alle CBF α (*core-binding factor*, CBF) Transkriptionsfaktoren besitzt AML1 (Synonym RUNX1, CBFA2) eine '*runt-homology domain*', genannt nach der Homologie mit dem *Drosophila melanogaster* '*runt*'-Gen, das frühe Entwicklungsstadien in der Drosophila-Embryogenese kontrolliert. Sowohl AML1 als auch CBF β werden zur Bildung von hämatopoetischen Stammzellen benötigt und sind Hauptregulatoren der Hämatopoese auf verschiedenen Stufen. Es wird angenommen, dass die HSC aus einem Hämangioendothelium differenzieren, das aus Endothelzellen besteht, die die Umbilicalvenen, den vorderen Anteil der AGM-Region (Aorta, Gonaden, Mesonephron) und den Dottersack säumen. Knockout-Untersuchungen von AML1 haben gezeigt, dass AML1, ähnlich wie CBF β , essentiell für die normale fetale Hämatopoese aller Zellreihen ist.^{119,120,129} Das Fehlen von AML1 führt zur Nekrose und zu Hämorrhagien im ZNS.¹²⁹

CBF können sowohl als Aktivatoren und Repressoren der Transkription wirken, in Abhängigkeit vom Zielgen und Zelltyp. AML1 bindet an einer Zielsequenz, die häufig in den Promotor/Enhancer-Regionen von eukaryotischen Genen vorkommt. Diese Zielsequenz wurde in den regulatorischen Elementen von myelo-spezifischen Genen identifiziert, z.B. der Myeloperoxidase, Neutrophil-Elastase, GM-CSF und CSFR1 (M-CSF-Rezeptor) (beide wichtig für die myeloische Zellreifung und -differenzierung),¹³⁰ des IL-3- und IL-5-Gens und im Enhancer-Bereich von TZR-Genen (TZR- β , - γ , - δ) (spezifische Immunantwort).^{131,132} Die meistens der bisher identifizierten Zielgene werden von den CBF aktiviert. Die Ausnahme bildet der Promotor des *CDKN1A*- Gen (WAF1, p21, CIP1). WAF1 ist ein zyklinabhängiger Kinaseinhibitor.

Funktionelle Untersuchungen ergaben, dass die *splicing*-generierten AML1B- und AML1A-Isoformen entgegengesetzte Effekte auf die Transkription von Testgenen und auf die Zelldifferenzierung ausüben.¹³²⁻¹³⁴ Die Überexpression von AML1A verhindert die Differenzierung von Granulozyten und stimuliert die Proliferation von myeloischen Zelllinien.¹³⁵ Die AML1A-Variante besitzt eine höhere DNA-Bindungsaffinität als AML1B und supprimiert dominant die AML1B-Transkriptionsaktivierung. AML1A weist keine Transkriptionsaktivität auf und wirkt daher im Gegensatz zu AML1B als negativer Regulator der Genexpression. Diese antagonistischen Effekte könnten für die Leukämogenese und hämatopoetische Differenzierung eine Rolle spielen. Dies wird durch die Ergebnisse von Tanaka et al.¹³⁴ untermauert, die eine erhöhte Expression der AML1A-Variante im Knochenmark von AML-Patienten feststellten.

Der dominant negative Effekt von AML1A auf die Transaktivierung durch AML1B würde damit zur Leukämogenese und/oder zur Ausprägung des unreifen myeloischen Phänotyps beitragen.

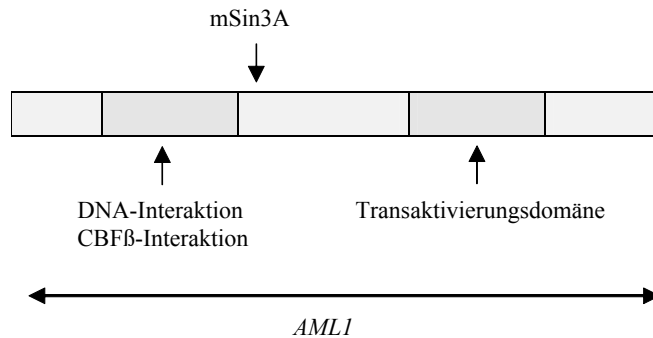


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Transkriptionsfaktors AML1 mit DNA- und Proteininteraktionsdomänen

Beide Gene des TF-Komplexes AML1/CBF β sind an die bei AML am häufigsten vorkommenden Translokationen involviert, t(8;21) (*AML1* ca. 10 % der AML) und inv(16) (*CBF β* ca. 8 %).¹³⁶ Zusätzlich ist *AML1* mit noch höherer Frequenz an Translokationen bei ALL im Kindesalter beteiligt (ca. 20 - 25 %).^{24-29,115,137} In der bei AML (FAB-M2) häufig vorkommenden Translokation t(8;21)(q22;q22) ist *AML1* mit *ETO* fusioniert, in der bei sekundären Leukämien auftretenden selteneren t(3;21)(q26;q22) mit *EAP*, *MDS1* und *EVII*. Weitere Translokationen sind t(5;21) und t(17;21). *CBF β* ist in der inv(16)(p13;q22) mit *MYH11* fusioniert.

Genetische Aberrationen von *AML1* werden auch mit therapieinduzierten Leukämien in Verbindung gebracht.¹³⁸ DNA-Topoisomerase II Inhibitoren vermögen reproduzierbare Sequenzspezifische DNA-Doppelstrangbrüche in entsprechenden Regionen des *AML1*-¹³⁹ oder *MLL*-Gens zu induzieren. Dies könnte ein initialer Schritt in der Entstehung von chromosomalen Translokationen mit darauf folgender Entwicklung einer Leukämie sein.

In allen Fusionstranskripten *AML1-ETO*, *-EAP*, *-MDS1* und *-EVII* ist das *AML1*-Gen nach der runt-Domäne (RHD) durch den Translokationsbruchpunkt unterbrochen und der 5'-Anteil wird mit dem Gen des anderen Chromosoms fusioniert.¹⁴⁰ Die AML1-Fusionsproteine vermögen weiterhin mit der CBF β -Untereinheit zu dimerisieren und an dem AML1-spezifischen Promotor/Enhancer DNA-Motif zu binden.¹³² Diese chimären AML1-Fusionsproteine bzw.

andere AML1-Veränderungen wirken als Kompetitoren und somit als Repressoren AML1-abhängiger Promotoren und führen zur Unterdrückung der transkriptionellen Aktivierungsfunktion von normalem AML1B.^{130,140}

Zusammenfassend läßt sich formulieren, dass der Transkriptionsfaktorkomplex AML1/CBF β regelt entscheidende Schritte in der Zelldifferenzierung hämatopoetischer Zellen auf HSC-Niveau und während verschiedener Stufen der Entwicklung regelt. Störungen der AML1/CBF β -kontrollierten Transkriptionskaskade stellen einen der häufigsten Transformationsmechanismen in Leukämien dar.

3.1.2.3 *TEL-AML1* positive ALL

Obwohl die Mechanismen der zellulären Transformationen durch Veränderungen von TEL nicht geklärt sind, scheint sicher, dass Deletionen von und Fusionen mit *TEL* zu verschiedenen malignen hämatologischen Erkrankungen beitragen. Die Frage warum die *TEL-AML1*-Genfusion nur in BVZ-ALL vorkommt, konnte bisher nicht beantwortet werden. Möglicherweise spiegelt dieses selektive Vorkommen von *TEL-AML1* eine spezifische Wirkung des Fusionsproteins auf die Differenzierung und weniger auf die Proliferation und/oder das Überleben von B-Vorläuferzellen wider. Es konnte gezeigt werden, dass das TEL-AML1-Fusionsprotein dominant die AML1-abhängige Transkription von Zielgenen stört.^{141,142} Dadurch werden die Regulationsmechanismen für normales Wachstum und Differenzierung von hämatopoetischen Zellen möglicherweise beeinflusst und die Leukämogenese gefördert.

Die transformierende, onkogene Wirkung der Fusionsproteine von TEL mit verschiedenen Tyrosinkinasen (TEL-PDGFR β , TEL-ABL, TEL-JAK2, TEL-NTRK3, TEL-ARG(ABL2)) wird vermutlich durch Dimerisierung der Fusionsproteine bewirkt, vermittelt durch die HLH-Domäne von TEL. Das bei CMML vorkommende Fusionsprotein TEL-PDGFR β dimerisiert mittels der HLH-Domäne von TEL, wodurch die Tyrosinkinase des PDGF-Rezeptors aktiviert und wachstumsfaktorunabhängiges Zellwachstum vermittelt wird.¹⁴³ Das bei CML gefundene TEL-JAK2 Fusionsprotein erfährt gleichermaßen eine Aktivierung der JAK-Tyrosinkinase durch Dimerisierung der TEL-HLH Domänen, und kann myelo- und lymphoproliferative Erkrankungen im Mausmodell auslösen.¹⁴⁴⁻¹⁴⁶

Das Fusionsprotein TEL-AML1 kann Homo- oder Heterodimere mit dem Wildtyp TEL oder anderen ETS-Mitgliedern bilden und könnte somit zur Transformation hämatopoetischer Zel-

len beitragen.¹⁴⁷ Durch diese Interaktionen wird die transkriptionsaktivierende Wirkung von AML1 in eine repressorische konvertiert. Sowohl die HLH/PNT-Domäne von TEL als auch die *runt homology* Domäne von AML1 (und weitere C'-gelegene AS) scheinen für die Vermittlung der Repression der Gene entscheidend zu sein, die normalerweise durch AML1 aktiviert werden.¹⁴⁸ Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die HLH/PNT Domäne mit UBC9 interagiert, einem Ubiquitin-konjugierenden Enzym.¹⁴⁹ Anstelle der Degradierung des Fusionsproteins wird durch die Bindung an UBC9 eine posttranslationelle Modifizierung durch SUMO-1 herbeigeführt.¹⁴⁷ SUMO-1 ist ein Ubiquitin-ähnliches Protein, das für die nukleäre Lokalisierung von TEL und auch von TEL-AML1 verantwortlich ist. Das Expressionsmuster von TEL-AML1 im Nukleus ähnelt dem von TEL und unterscheidet sich von dem von AML1. Die TEL-spezifischen Nuklearkörperchen werden vorzugsweise in der S-Phase exprimiert, die Beziehung zwischen dieser Beobachtung und der Rolle von TEL-AML1 im Zellzyklus ist noch unbekannt.

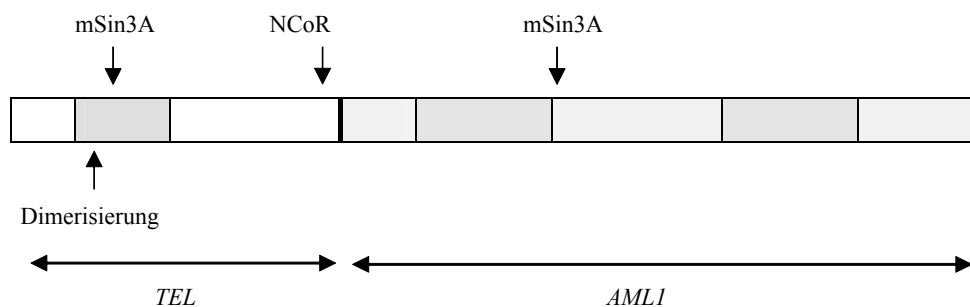


Abbildung 7: Schematische Darstellung von TEL-AML1 mit bekannten Korepressorinteraktionsregionen

Die HLH/PNT Domäne und die zentrale Region von TEL scheinen auch für die Vermittlung der Repression durch Bindung an nuklearen Repressoren wie SMRT, mSin3A und NCoR zu sein.^{123,150} Beide Regionen sind in vielen TEL-Fusionsproteinen enthalten. Die maximale Repression wird durch die Bindung von mSin3A und NCoR an TEL erzielt, dabei binden mSin3A an die HLH/PNT und NCoR an die zentrale Domäne.^{142,151} Die transkriptionelle Repression, die durch die zentrale TEL-Region vermittelt wird, wird durch Histondeacetylase-3 (HDAC3) Inhibitoren aufgehoben. Dies veranschaulicht die Funktion von NCoR und mSin3A in der Rekrutierung der HDAC-Komplexe.^{125,142,150} Ebenfalls kann AML1 an mSin3A binden und mit HDAC assoziieren. Die Aufhebung der transkriptionellen Veränderung von *TEL-*

AML1-positiven Zellen durch HDAC-Inhibitoren könnte deren möglichen zukünftigen Einsatz in der antileukämischen Therapie begründen.

Durch Hemmung von AML1 oder generell des CBF-Komplexes wird die normale myeloische und lymphatische Differenzierung im Knochenmark blockiert.¹⁵² Ebenfalls wird die Apoptose in Ba/F3-Zellen verlangsamt. Andererseits führt die Inhibition von CBF auch zur Verzögerung der G₁-Progression in myeloischen und lymphatischen Zellen. Diese Beobachtungen lassen die Vermutung zu, dass hämatopoetische Zellen, die CBF-Onkoproteine exprimieren, in einem sehr frühen Differenzierungsstadium blockiert und unfähig sind, zu proliferieren.¹⁵³ Eine weitere häufige genetische Alteration bei ALL im Kindesalter sind entweder kombinierte oder einzelne homozygote Deletionen der Tumorsuppressorgene (TSG) p16^{INK4a}, p15^{INK4b} und p19^{ARF} (chromosomale Region 9p12) (s. Abschnitt 3.4, Projekt 4). Diese sind bei 5-20 % der BVZ-ALL bzw. 60-80 % der T-ALL bei Ersterkrankung¹⁵⁴ oder beim Rezidiv nachweisbar.¹⁵⁵ Obwohl die prognostische Relevanz der TSG-Deletion bisher noch nicht endgültig geklärt ist, scheint ein Zusammenhang mit der Pathogenese bestimmter Translokationsleukämien zu bestehen. Während die Transduktion eines retroviralen, TEL-AML1-exprimierenden Vektors nur in 2/9 bestrahlten Mäusen eine Leukämie (1 T-ALL, 1 B-ALL) induzieren konnten, starben 6/9 die simultan eine Deletion o.g. Gene aufwiesen.¹⁵³ Die Deletion der TSG ermöglicht es möglicherweise, dass lymphatische Stammzellen trotz der Präsenz von TEL-AML1 proliferieren und höhere TEL-AML1 Spiegel gebildet werden, die eine effektivere Hemmung der Differenzierung und Apoptose bewirken.

Neuere Untersuchungen unterstützen die Hypothese, dass *TEL-AML1* positive ALL einer CD34⁺CD19⁺ lymphatischen Vorläuferzelle entstammen.¹⁵⁶ Dies widerspricht nicht der derzeitigen Auffassung, die eine Beteiligung eines mehr primitiven Vorläufer- / Stammzellkompartiments vor allem in Hochrisiko-ALL annimmt. Klinische Studien haben gezeigt, dass die Prednison-Response einen signifikanten prognostischen Faktor darstellt.¹³ Es kann daher spekuliert werden, dass in ALL-Gruppen mit einer guten Prognose, wie z.B. *TEL-AML1* positiver ALL, die Leukämie von einer lymphatischen, Steroidrezeptor-positiven Vorläuferzelle entstammt, die zur Apoptose bestimmt ist. Sowohl *TEL-AML1*⁺ BVZ-ALL als auch *HOX11*-exprimierende T-ALL, die beide mit einer guten Prognose assoziiert sind, sind auf analogen Differenzierungsstufen in der B- (CD34⁺, CD10⁺, CD19⁺) und T-Lymphozytenentwicklung (CD1⁺, CD10⁺) arretiert. Diese repräsentieren B- und T-Differenzierungsstadien, während

derer die Zellen bei ausbleibendem Signal von den Antigenrezeptorgenen normalerweise programmiert sind zu sterben.¹⁵⁷

Andererseits könnte die Leukämie von Patienten mit prognostisch ungünstiger Subgruppe einer pluripotenten/Stammzelle, die resistent gegenüber Apoptose ist, entstammen. Dies impliziert, dass die Biologie der Leukämie nicht nur durch die genetische Rekombination, die zur malignen Transformation beiträgt, sondern auch von zellulären Parametern der Vorläuferzelle abhängt, wie z.B. dem Genexpressionsprofil, in der die Transformation stattfindet. Diesbezüglich könnten im Besonderen genomweite Expressionsanalysen neue, richtungsweisende Erkenntnisse über die Pathogenese und die Behandlung von Leukämien liefern.^{93,94,157-160}

3.1.3 Translokationsleukämien – Prävalenz und Prognosefaktor beim Rezidiv

Während der letzten Jahre konnten wir Wesentliches zur Diskussion über Prävalenz und prognostische Bedeutung bestimmter Fusionstranskripte bei ALL-Rezidiven im Kindesalter international beitragen. So ist z. B. die mittelfristige Prognose von Kindern mit *TEL-AML1* positiver ALL auch nach einem Rezidiv eher günstig. Dagegen haben Kinder mit *BCR-ABL*, oder *E2A-PBX1* [t(1;19)] positiven oder auch Leukämien mit 11q23-Aberrationen (*MLL-AF4*, *MLL-AF9*, *MLL-ENL*) eine schlechte Prognose. Intensivere Therapien, z. B. eine allogene SZT sind bei solchen Leukämien gerechtfertigt und könnten die Prognose der Kinder verbessern. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 4 (alle ALL-Rezidive) und Tabelle 5 (ALL-Erstrezidiv und ALL-REZ BFM Studienpatienten) sowie in der Abbildung 8 wiedergegeben.^{24-26,30-32}

Tabelle 4: Prävalenz von Fusionstranskripten bei ALL-Rezidiven
(Gesamtkollektiv; nicht publizierte Daten)

Fusi- onstranskript		ALL-Immunphänotyp							
		BCP		(prä-)T		nd		Total	
		N	%	N	%	N	%	N	%
<i>TEL-AML1</i>	+	74	17.4			2	10.5	76	15.6
	-	352	82.6	42	100.0	17	89.5	411	84.4
	Total	426		42		19		487	
<i>BCR-ABL</i>	+	46	8.6	2	2.4	1	4.0	49	7.7
	-	487	91.4	80	97.6	24	96.0	591	92.3
	Total	533		82		25		640	
<i>E2A-PBX1</i>	+	5	1.6					5	1.4
	-	301	98.4	31	100.0	11	100.0	343	98.6
	Total	306		31		11		348	
<i>MLL-Aberr.</i>	+	10	11.5					10	9.7
	-	77	88.5	10	100.0	6	100.0	93	90.3
	Total	87		10		6		103	

BCP = B-Zellvorläufer; nd = nicht durchgeführt

Tabelle 5: Prävalenz von Fusionstranskripten bei ALL-Erstrezidiven
(ALL-REZ BFM)(nicht publizierte Daten)

Fusi- onstranskript	ALL-Immunphänotyp								
		BCP		(prä-)T		nd		Total	
		N	%	N	%	N	%	N	%
<i>TEL-AML1</i>	+	54	16.2			1	7.7	55	14.5
	-	279	83.8	33	100.0	12	92.3	324	85.5
	Total	333		33		13		379	
<i>BCR-ABL</i>	+	39	9.4	2	3.0			41	8.2
	-	374	90.6	65	97.0	18	100.0	457	91.8
	Total	413		67		18		498	
<i>E2A-PBX1</i>	+	5	2.1					5	1.9
	-	230	97.9	26	100.0	8	100.0	264	98.1
	Total	235		26		8		269	
<i>MLL-Aberr.</i>	+	8	11.8					8	9.9
	-	60	88.2	8	100.0	5	100.0	73	90.1
	Total	68		8		5		81	100.0

BCP = B-Zellvorläufer; nd = nicht durchgeführt

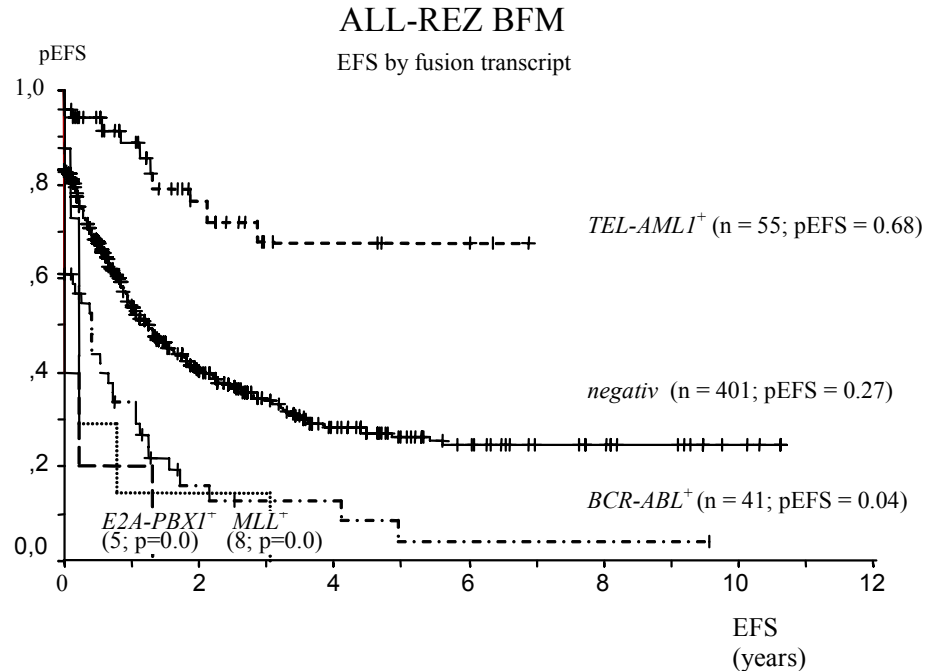


Abbildung 8: Kaplan-Meier Kurven der Wahrscheinlichkeit des EFS von Kindern mit ALL-Erstrezidiv in Abhängigkeit von dem Vorliegen eines Fusionstranskripts.

3.1.3.1 Klinische Signifikanz von *TEL-AML1* bei ALL-Rezidiven

Prospektive und retrospektive Analysen: Das *TEL-AML1*-Fusionstranskript resultiert aus der zytogenetisch nur in 0.05 % der ALL im Kindesalter nachweisbaren Translokation t(12;21)(p13;q22). Die durch molekulare Techniken nachgewiesene *TEL-AML1*-Frequenz beträgt bei initialer BVZ-ALL im Kindesalter ungefähr 20 %.^{28,29,115,137,161,162} In sechs Studien von ALL-Ersterkrankungen war das Vorhandensein der *TEL-AML1*-Fusion mit einer sehr guten Prognose assoziiert.^{27-29,115,137,162} Die Prävalenz und prognostische Bedeutung von *TEL-AML1*-Fusionstranskripten bei ALL-Rezidiven ist Gegenstand einer intensiven Diskussion.^{24-26,163,164} Wir konnten die bisher größte Zahl von ALL-Rezidivpatientenproben auf das Vorliegen des *TEL-AML1*-Fusionstranskripts untersuchen und mit diesen Daten Wesentliches zu der kontroversen Diskussion, ob *TEL-AML1*-positive ALL-Rezidive eine Gruppe mit günstigerer Prognose darstellen, beitragen.^{24-26,30} Die Analyse der pEFS nach dem Rezidiv einer BVZ-

ALL zeigt, eine signifikant höhere EFS-Wahrscheinlichkeit in der Gruppe der *TEL-AML1*-positiven Patienten.^{24,26,30}

Match-pair Analyse: In einer *match-pair* Analyse von 249 Kindern mit erstem Rezidiv einer *BCR-ABL* negativen BVZ-ALL, die entsprechend der Therapieoptimierungsstudie ALL-REZ BFM 96 behandelt wurden, konnten wir nochmals bestätigen, dass der genetische Marker *TEL-AML1*-Fusion Patienten (n=53) mit einer günstigen Prognose identifiziert.³⁰ Match-Parameter waren die etablierten, prognostisch-signifikanten Faktoren beim Rezidiv (Zeitpunkt, Lokalisation des Rezidivs; Alter, Blastenzahlen).

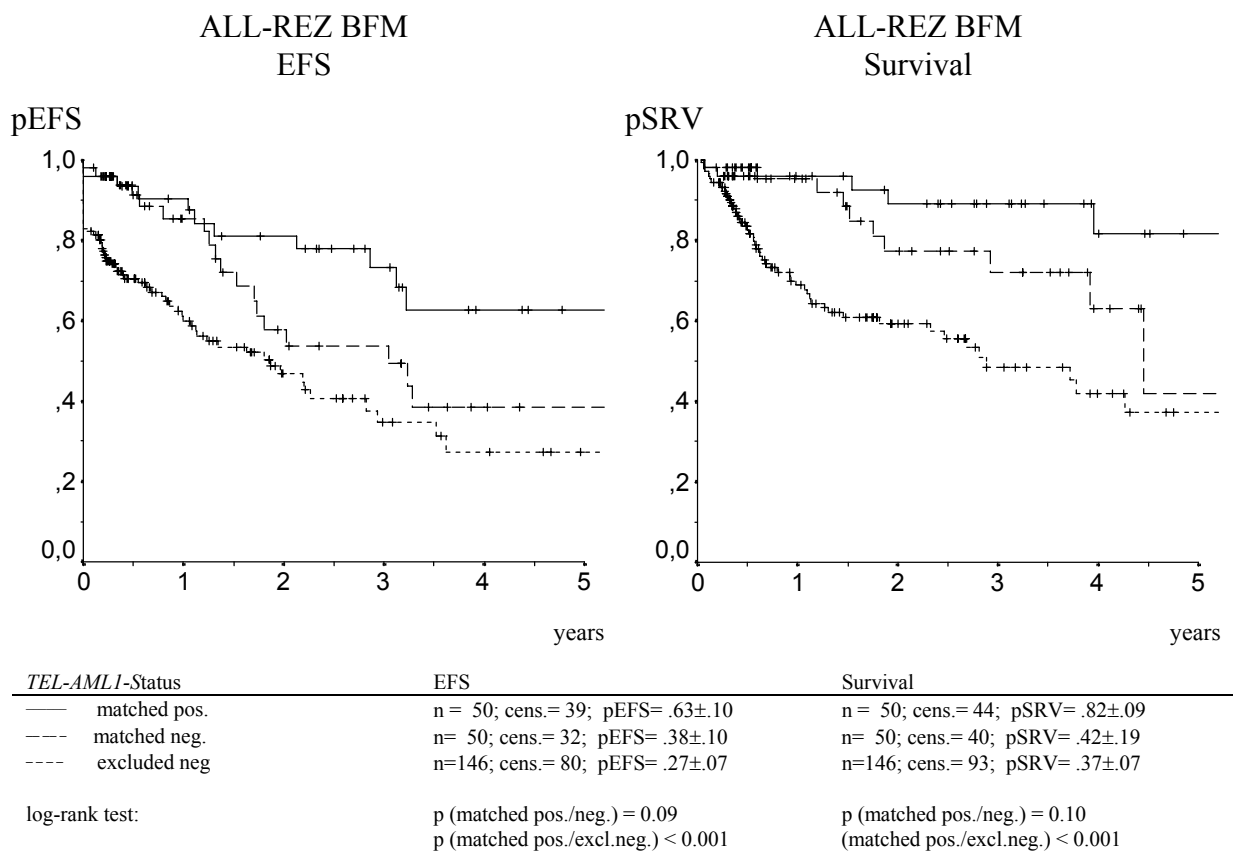


Abbildung 9: Wahrscheinlichkeit des EFS und des Überlebens von gematchten Paaren entsprechend dem Vorhandensein der *TEL-AML1*-Fusion und den ausgeschlossenen *TEL-AML1*-Patienten.

Bei einer medianen Beobachtungszeit von 2.77 Jahren (0.28 - 12.81 Jahre) war die Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens (pEFS) nach 5 Jahren 0.63 (SD 0.10) für die gepaarten *TEL-AML1*⁺ Patienten (n = 50) und 0.38 (SD 0.10) für negative Patienten. Obwohl ein

Trend zu einem besseren pEFS und Gesamtüberleben der gepaarten *TEL-AML1*⁺ positiven Gruppe (50 Patienten) geht, war der Unterschied zum Zeitpunkt der Analyse (noch) nicht signifikant ($p = 0.09$ und 0.10). Demgegenüber war das pEFS (0.28 ± 0.07) und Gesamtüberleben (0.38 ± 0.07) der ausgeschlossenen negativen Gruppe im Vergleich mit der matched positiven ($p < 0.001$ und $p < 0.001$) und der matched negativen Gruppe ($p = 0.028$ und $p = 0.007$) signifikant schlechter. Diese Analyse unterstreicht noch einmal, dass die *TEL-AML1*-Fusion eine ALL-Entität genetisch charakterisiert, die mit etablierten günstigen prognostischen Parametern assoziiert ist (Abb. 4). Entsprechend sollte die *Indikation* für therapeutische Konzepte mit höherem Mortalitäts- und Morbiditätsrisiko, wie z.B. die allogene Stammzelltransplantation, bei *TEL-AML1* positiven ALL-Rezidiven sehr restriktiv in Betracht gezogen werden.

3.1.4 Zusammenfassende Diskussion: *TEL-AML1* positive ALL

Anfänglich publizierte Studien des *Dana Farber Cancer Institutes* (DFCI) und des *St. Jude Children's Research Hospitals* (SJCRH) zeigten sehr gute Langzeitheilungschance von Kindern mit *TEL-AML1* positiver ALL-Ersterkrankung (100 % 8-Jahres EFS bzw. 92 % 5-Jahres EFS; Tabelle 6).^{29,115} Diese günstigen Berichte wurden jedoch durch unsere Auswertungen von ALL-Rezidiven (BFM-Studiengruppe) gedämpft.^{23-26,30} Wir fanden eine ähnliche Inzidenz von *TEL-AML1* Positivität (ca. 20 %) in den Leukämiezellen von Kindern mit BVZ-ALL-Rezidiv, die entsprechend der Protokolle ALL-REZ BFM behandelt wurden. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den retrospektiven Analysen - allerdings an einer kleinen Patientenzahl - der *Pediatric Oncology Group* (POG) und des DFCI (s. Tabelle 6).^{163,165} Anhand dieser sich anscheinend widersprechenden Datenlage lassen sich einige wichtige Punkte hervorheben, die einen Einfluss sowohl auf die Effektivität der Therapie als auch der Auswertung und Interpretation der Ergebnisse haben.

Tabelle 6: Zusammenstellung der Ergebnisse internationaler Behandlungsstudien über Prävalenz und prognostischer Bedeutung der *TEL-AML1* Fusion bei Kindern mit ALL-Ersterkrankung und -Rezidiv

Gruppe	Jahr	Anzahl (n)	<i>TEL-AML1</i> ⁺ %	SR	MR	HR	pEFS <i>TEL-AML1</i> ⁺	pEFS <i>TEL-AML1</i> ⁻	Beobachtungszeit (median, Jahre)
SJCRH ²⁹	1995	126 (BVZ)	28				92	70	5
DFCI ¹¹⁵	1996	81 (BVZ)	27	11		11	100	70	8.3
SJCRH ²⁸	1997	188 (BVZ)	25				91	65	5
BFM/AIEOP ²⁷	1997	286 (BVZ)	29	4	59		90	79	4
AIEOP ¹⁶⁶	1997	51	22	10		1	81	nd	1.3
8511/8610 ¹⁶⁷	1998	37	30				55	61	5
9104 ¹⁶⁷	1998	57	17	10			100	70	4
INS ¹⁶⁸	1999	98	24				82	69	4.7
CCG-mixed ¹⁶⁹	2000	86	17	7	4	4	81	54	7
UK-ALL XI ¹⁷⁰	2001	659	19				63	63	5
DCLSG ¹⁷¹	2001	105	21				82	74	5
HK-UKALL XI ¹⁷²	2001	67	18				60	56	5
CCG-1952 ¹⁷³	2001	504	19	95			99	92	2.5
BFM-Rezidiv ²³	1997	44	20		8	1			
BFM-Rezidiv ²⁴	1998	133 (BVZ)	24	3	21	8	79	22	2
BFM-Rezidiv gesamt ²⁵	1999	268 (BVZ)	18	3	43	8			
prospektiv ²⁵	1999	178 (BVZ)	17		28	3			
DFCI-Rezidiv ¹⁶⁵	1998	32	6						
SJCRH-Rezidiv ¹⁶³	1999	49	10						
Tschechien-Rezidive ¹⁷⁴	1999	45	10						

3.1.4.1 Therapiestratifizierung und Intensität der Behandlung

Die Heterogenität des Behandlungserfolges von Kindern mit ALL steht in direktem Zusammenhang mit der Therapiestratifizierung, die von den berücksichtigten Risikofaktoren und der Intensität der Behandlung abhängt. Bisher stellte die Zuordnung der Patienten in bestimmte Risikogruppen zum *Zeitpunkt der Diagnose* den wichtigsten Parameter zur Festlegung der Intensität der applizierten Therapie dar. Die Kriterien, die von den kooperativen Studiengruppen zur Risikostratifizierung angewandt werden, variieren jedoch national und international erheblich. Zur Vereinheitlichung der Therapiestratifizierung wurde in den 90er Jahren eine Risikoabschätzung anhand des Alters, der Leukozytenzahl, des ALL-Immunphänotyps, genetischer Merkmale und, in einigen Studien, das Ansprechen auf Prednison (*prednisone response*) vorgenommen (s. Abschnitt 2.1.1.1). Während Patienten mit *TEL-AML1* positiver ALL, die entsprechend den Protokollen des DFCI¹¹⁵ bzw. des SJCRH²⁹ behandelt wurden, aufgrund dieser Kriterien häufig dem Hochrisikozweig mit einer intensiveren Therapie zugeordnet wurden, gehörten die Patienten mit *TEL-AML1* positiver ALL der BFM-Gruppen, die ein Re-

zidiv erlitten hatten,^{24-26,30} in der Erstbehandlung zu dem niedrigen bzw. mittleren Risikozweig mit geringer Therapieintensität. Diese Beobachtung wird durch Ergebnisse von Studien der *Children's Cancer Group* (CCG)¹⁶⁹ und aus Israel¹⁶⁸ unterstützt. Die Erhöhung der Intensität in diesen Protokollen führte zu einer Verbesserung der Behandlungserfolge von Kindern mit *TEL-AML1* positiver ALL.

3.1.4.2 Einfluss der Beobachtungszeitdauer auf die Prognose

Trotz der erheblichen Differenzen bezüglich der Inzidenz von *TEL-AML1* beim Rezidiv stimmen alle Rezidivstudien darin überein, dass *TEL-AML1* Positivität mit einer sehr langen ersten Remissionsdauer assoziiert ist. Anhand der genetischen Determinante *TEL-AML1* wird damit erstmalig deutlich, dass zur Erfassung des tatsächlichen Behandlungserfolges (EFS, Überleben) sehr lange Beobachtungszeiten benötigt werden. Entsprechend müssen alle klinischen Studien kritisch interpretiert werden, die den prognostischen Stellenwert der *TEL-AML1* Fusion untersuchen. Dieses Erkenntnis gilt auch für die Wertigkeit anderer prognostischer Faktoren, wie am Beispiel der häufigen homozygoten Deletionen der Tumorsuppressorgene *p15^{INK4b}* und *p16^{INK4a}* dargelegt wurde (s. Abschnitt 3.4.2). Folglich erlauben besonders die zum Zeitpunkt des ALL-Rezidivs erhobenen genetischen und klinischen Parameter deren prognostische Relevanz bei der Erstdiagnose und deren Einfluss auf die Therapieeffektivität zu validieren.

3.1.4.3 Einfluss der Chemotherapeutika auf die Therapieeffizienz

In *in vitro* Analysen zeigten *TEL-AML1* positive Zellen eine hohe Sensitivität gegenüber Steroiden, Vincristin und Asparaginase.¹⁷⁵ Ebenfalls wurde eine geringere intrazelluläre Akkumulation an Methotrexat-Polyglutamat gemessen.¹⁷⁶ Aufgrund dieser *in vitro* Ergebnisse und durch den Vergleich der eingesetzten Chemotherapeutika sowie deren Dosierungen in den verschiedenen Protokollen, ist es vorstellbar, dass *TEL-AML1* positive ALL besser durch maximale Dosierungen von Asparaginase und Antimetaboliten (6-Mercaptopurin, Methotrexat) zu behandeln sind.^{175,176}

3.1.4.4 Einfluss von wirtseigenen Faktoren

Zusätzlich zur Beobachtung, dass *TEL-AML1* Positivität mit einem jüngeren Erkrankungsalter und mit niedrigen Leukozytenzahlen assoziiert ist, weisen einige ethnische Gruppen (Spanier, Koreaner) eine geringere Inzidenz von *TEL-AML1* positiven ALL auf. Es ist vorstellbar, dass hereditäre Faktoren das Auftreten des (genetischen) ALL-Subtyps mitbestimmen. Obwohl Polymorphismen der Methylenetetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) mit der Entwicklung von Leukämien mit einer *MLL*-Rekombination (11q23) assoziiert sind, konnte kein Zusammenhang mit der *TEL-AML1* Fusion gefunden werden.¹⁷⁷ Andere Polymorphismen, einschließlich der die Zytochrom-P450-Familie und Glutathion-Transferasen betreffenden (s. Abschnitt 3.6, Projekt 6), sind ebenfalls mit einem erhöhten ALL-Risiko verbunden, jedoch nicht spezifisch mit *TEL-AML1* positiver ALL. Außerdem ist es denkbar, dass weitere Wirtsfaktoren unabhängig von der behandelten Leukämie oder der angewandten Therapie die Chemosensitivität determinieren (s. Abschnitt 3.6).

Trotz aller Differenzen stimmen die klinischen Studien darin überein, dass *TEL-AML1*-positive ALL spät rezidivieren und sich auffallend sensitiv gegenüber einer erneuten Chemotherapie verhalten. Kinder mit erstem Rezidiv einer *TEL-AML1*-positiven ALL haben eine signifikant bessere Überlebenswahrscheinlichkeit als solche mit *TEL-AML1*-negativen ALL-Rezidiven.^{24-26,30,163,165} In einer *match-pair* Analyse konnten wir zeigen (ALL-REZ BFM), dass der genetische Parameter *TEL-AML1* im Rezidivfall zwar keinen unabhängigen prognostischen Faktor darstellt, jedoch ein statistisch grenzwärtig signifikanter Trend zu einer besseren Prognose von Kindern mit *TEL-AML1* positiven ALL-Rezidiv zu beobachten war.³⁰ Einschränkung muss erwähnt werden, dass die Beobachtungszeit in dieser Analyse noch sehr kurz war. Eine Analyse zu einem späteren Zeitpunkt wird möglicherweise die Unterschiede klarer hervorheben. *Match*-Kriterien waren Zeit und Lokalisation des Rezidivs, Leukozytenzahl, *BCR-ABL* Negativität und Alter beim Rezidiv. In anbetracht der exzellenten pEFS von über 50 %, die durch alleinige Chemotherapie erreicht werden, zeigen unsere Analysen, dass Kinder mit *TEL-AML1* positiven ALL-Rezidiven keiner Therapie, die mit einem nicht vertretbaren höheren Risiko assoziiert ist (z.B. allogene Stammzell-Transplantation) zugeführt werden sollten.

Sensitive und spezifische molekulare Verfahren, die das individuelle Ansprechen auf die Induktionstherapie besser zu quantifizieren vermögen, sind möglicherweise fähig, zusätzliche Informationen zu liefern, die eine adäquatere Risikoabschätzung und der damit assoziierten

Intensität der Therapie erlauben (s. Abschnitt 3.2.2). Entsprechend haben einige kleinere Studien die prognostische Signifikanz der *TEL-AML1* Fusion in Abhängigkeit der molekularen Response analysiert. In diesen Analysen korrelierte die Menge der *TEL-AML1* Fusionstranskripten während der frühen Phasen der Therapie mit einer höheren Resistenz und letztlich mit einem Rückfall.^{178,179} Diese Ergebnisse stimmen mit denen größerer Studien überein. In den gegenwärtigen ALL-Ersterkrankungs- und –Rezidiv-Therapieoptimierungsstudien in Europa (BFM, AEIOP, DCLSG, UKALL) wird die quantitative molekulare Bestimmung der Reduktion der Leukämiezelllast (MRD) während der Induktionstherapie als ein wesentliches Kriterium zur frühen Erfassung des Rezidivrisikos und zur Bestimmung der Dosisintensität (Therapiestratifizierung) angewandt (s. Abschnitte 2.1 und 3.2).

3.1.5 *BCR-ABL* positive ALL

Bei ALL im Kindesalter sind Leukämien, die eine Translokation der Chromosomen 9 und 22 t(9;22) tragen, mit einer besonders schlechten Prognose behaftet. Die Translokation t(9;22) führt zu einer Fusion der Gene, die für die Proteine BCR und ABL kodieren. Diese *BCR-ABL* Genfusion wird bei ca. 3-5 % der ALL-Ersterkrankungen^{180,181} und, wie wir zeigen konnten, bei 9-10 % der ALL-Rezidive nachgewiesen.^{31,32} Die Zuverlässigkeit der *BCR-ABL* Diagnostik zum Zeitpunkt der Diagnose und während der Therapie der ALL wird durch Ringversuche zur Qualitätssicherung gewährleistet.¹⁸²

3.1.5.1 Klinische Signifikanz von *BCR-ABL* bei ALL-Rezidiven

Unsere Untersuchungen an ALL-Rezidiven zeigen, dass die Prävalenz der *BCR-ABL* Positivität unter den Rezidiven, übereinstimmend mit der schlechten Prognose bei ALL-Ersterkrankung, nicht nur erhöht ist sondern auch dass eine zweite Remission nur bei 60 % der *BCR-ABL*⁺-ALL gegenüber 91 % bei *BCR-ABL*⁻-ALL induziert werden kann.^{31,32} Diese Beobachtung spiegelt sich auch in der signifikant schlechteren ereignisfreien 2-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von *BCR-ABL*⁺- gegenüber *BCR-ABL*⁻-ALL-Rezidiven wieder (pEFS 0.08 vs. 0.50; p = 0.003).³¹ Die *BCR-ABL*-Positivität ist weiterhin bei Rezidivdiagnose mit einer signifikant kürzeren Dauer der Erstremission sowie einer höheren Anzahl an Leukozyten und peripheren Blasten assoziiert. Übereinstimmend mit diesen Analysen konnte in einer *match pair* Analyse *BCR-ABL* Positivität bei ALL-Rezidiven als unabhängiger Risikofaktor identifiziert werden.³¹

3.1.5.2 Zusammenfassende Diskussion: *BCR-ABL* positive ALL-Rezidive

Für Patienten mit *BCR-ABL*⁺-ALL existiert bisher kein optimiertes Behandlungskonzept. Die Gesamtprognose von Kindern mit *BCR-ABL*⁺-ALL-Ersterkrankung oder -Rezidiv ist schlecht. Eine Verbesserung der Prognose kann bisher nur durch eine Stammzellreinfusion/-Transplantation erreicht werden: Dies betrifft vor allem Kinder, die keine hämatologische Remission erreichen. Molekulare (PCR-basierte) oder durchflusszytometrische Remissionsdaten liegen gegenwärtig noch nicht ausreichend vor.

Beruhend auf einer höheren intrinsischen Resistenz der *BCR-ABL* positiven Leukämiezellen gegenüber Zytostatika, zeigen Kinder mit *BCR-ABL*⁺-ALL bei Ersterkrankung und beim Rezidiv ein schlechteres Ansprechen auf die Polychemotherapie und insgesamt unzureichende Remissionsraten. Eine Erstremission wird bei 91 % der Kinder mit *BCR-ABL* positiver ALL erreicht, die ereignisfreie 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit liegt nur bei 38 %. Anhand der Prednison-Response können jedoch zwei Gruppen mit unterschiedlicher Prognose identifiziert werden: Während Prednison-*good responder* (PGR) eine 5-Jahres pEFS von 0.55 % (± 0.08) haben, ist die von Prednison-*poor responder* (PPR) nur 0.10 (± 0.07).⁹⁰

Die Heterogenität der *BCR-ABL* positiven ALL-Ersterkrankung spiegelt sich ebenfalls an der Leukozytenzahl und dem Alter wieder.¹⁸¹ In einer Meta-Analyse von 10 Studiengruppen und größeren Institutionen hatten die *BCR-ABL* Positiven die besten Heilungschancen (pEFS = 0.49 ± 0.05), die jünger als 10 Jahre waren und weniger als 50 G/l Leukozyten (NCI-Kriterien) hatten. Patienten mit hohen Leukozytenzahlen (>100 G/l) hatten die schlechteste (pEFS = 0.20 ± 0.05), alle anderen eine intermediäre Prognose (pEFS = 0.30 ± 0.05). Im Vergleich zur Chemotherapie war das Auftreten des Rezidivs der häufigste Grund des Therapieversagens. Eine bessere Heilungsrate konnte durch HLA-identische Verwandten-Transplantationen nicht jedoch durch nicht-identische Verwandten- oder autologe Transplantationen erreicht werden.

Im Falle eines Rezidivs haben Kinder mit *BCR-ABL*-positiver ALL nur eine Heilungschance, wenn ein passender Geschwisterspender oder Fremdspender für eine allogene Transplantation vorhanden ist. Gegenwärtige Konzepte zur Behandlung dieser Patientengruppe bestehen in der Durchführung einer intensiven Polychemotherapie zur Induktion einer Remission und der allogenen Stammzelltransplantation.

Die *BCR-ABL*-Fusion stellt nicht nur einen diagnostischen und prognostischen Leukämiezellmarker dar. Neuere experimentelle Ansätze bieten die Möglichkeit einer selektiveren *in* oder *ex vivo* Therapie von *BCR-ABL*-positiven Zellen, da eine zentrale Rolle der *BCR-ABL*-Fusionsproteine (p210 und p190) bei der Pathogenese der malignen Erkrankungen angenommen werden kann (s. Übersicht von Sawyers¹⁸³). Das durch *BCR-ABL* kontrollierte Signalkaskaden ist komplex und hochredundant.¹⁸⁴ Die Summe der Proteininteraktionen resultiert in einem alterierten Zelltyp mit mitogenaktivierten Signalkaskaden, defekter Adhärenz an Stromazellen und an die extrazelluläre Matrix sowie einem reduziertem Ansprechen auf Apoptosesignale. Durch *BCR-ABL* aktivierte Signalwege schließen die von Ras, Phosphatidylinositol-3-kinase/AKT, NF- κ B und Stat-5 ein. Eine Korrektur dieser einzelnen Defekte durch ein oder mehrere maßgeschneiderte Medikamente würde mit großer Wahrscheinlichkeit das Gleichgewicht wieder in Richtung einer normalen Hämatopoese verschieben.¹⁰²

In dieser Hinsicht erfolgreich bezüglich des Erreichens einer Remission war bereits der therapeutische Einsatz eines spezifischen *ABL*-Tyrosinkinase-Antagonisten (STI571) zur Hemmung der onkogenen Aktivität des *BCR-ABL* Fusionsproteins bei Erwachsenen mit *BCR-ABL*-positiver CML oder ALL,^{185,186} auch in der Blastenkrise.^{185,186} Nach einer unterschiedlich langen, STI571-induzierter Remissionsdauer wird jedoch die Entwicklung von verschiedenen Resistenzmechanismen in den *BCR-ABL*-positiven Leukämien beobachtet.¹⁸⁷ Ein rationaler therapeutischer Ansatz zur Prävention von Resistenzentwicklungen könnte eine Kombination therapeutischer Substanzen sein, die verschiedene, durch *BCR-ABL*-bedingte pathologische Veränderungen zum Ziel haben (z.B. IFN- α , Farnesyltransferase-Inhibitoren, Arsen-trioxid). Ebenso vorstellbar ist die *ex vivo* Stimulation (durch *BCR-ABL* Fusionspeptide) und Expansion von anti-*BCR-ABL*-spezifischen T-Zellen oder die Anwendung von *antisense*-Strategien (anti-*BCR-ABL*-Oligonukleotide oder *BCR-ABL*-spezifische siRNA) zum *ex vivo* Reinigen des Knochenmarks/Stammzellen bei autologen Transplantationen.

3.1.6 Publikationen zum Projekt 1

1. **Seeger K**, Stackelberg A, Taube T, Buchwald D, Körner G, Suttorp M, Dörffel W, Tausch W, Nürnberger M, Henze G, for the Berlin-Frankfurt-Münster Study Group: Relapse of *TEL-AML1* positive acute lymphoblastic leukemia in Childhood: A matched-pair analysis. *J Clin Oncology* 19:3188-93 (2001)
2. **Seeger K**, Buchwald D, Peter A, Taube T, von Stackelberg A, Schmitt G, Henze G: *TEL-AML1* fusion in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 94:374-6 (1999)
3. **Seeger K**, Adams HP, Buchwald D, Beyermann B, Kremens B, Niemeyer C, Ritter J, Schwabe D, Harms D, Schrappe M, Henze G: *TEL-AML1* fusion transcript in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. The Berlin-Frankfurt-Munster Study Group. *Blood* 91:1716-22 (1998)
4. **Seeger K**, Buchwald D, Taube T, Peter A, von Stackelberg A, Schmitt G, Kochling J, Henze G: *TEL-AML1* positivity in relapsed B cell precursor acute lymphoblastic leukemia in childhood. Berlin-Frankfurt-Munster Study Group. *Leukemia* 13:1469-70 (1999)
5. Beyermann B, Agthe AG, Adams HP, **Seeger K**, Linderkamp C, Goetze G, Ludwig WD, Henze G: Clinical features and outcome of children with first marrow relapse of acute lymphoblastic leukemia expressing BCR-ABL fusion transcripts. BFM Relapse Study Group. *Blood* 87:1532-8 (1996)

3.2 PROJEKT 2: MRD UND ANTIGENREZEPTOR-GENUMLAGERUNGEN BEI ALL-REZIDIVEN

Bisher zur Therapiestratifizierung verwendete Risikofaktoren von Kindern mit einer ALL-Ersterkrankung sind u.a. die initiale Leukozytenzahl, das Alter, der Immunphänotyp, zytogenetische Merkmale und das initiale Ansprechen auf die Therapie (*Prednison response; non-response*), beim Rezidiv der Zeitpunkt seines Auftretens, die Lokalisation und der Immunphänotyp (s. Tabelle 1). Zuverlässiger als bisher lassen sich das Ansprechen auf die Therapie und die Remissionsqualität durch den Nachweis residueller Leukämiezellen (*minimal residual disease*, MRD) mit hoch sensitiven molekularen und durchflusszytometrischen Methoden ermitteln. Bei Kindern mit ALL-Ersterkrankung und -Rezidiv konnte der hohe prädiktive Wert dieser Verfahren zur Einschätzung der Prognose und des Rezidivrisikos bereits belegt werden.^{14,15,22}

In prospektiven Studien bei ALL-Ersterkrankung und -Rezidiv wird gegenwärtig untersucht, wie diese Techniken angewandt werden können, um entsprechend Therapien zu modifizieren und ob sie zusätzliche bzw. bessere Informationen über das Ansprechen auf die Therapie (und damit über Prognose und Rezidivrisiko), ermöglichen. Es ist absehbar, dass hierdurch eine weitere Stratifizierung und z. B. bei Kindern mit ALL, die ein gutes Ansprechen auf die Therapie aufweisen, eine Therapiereduktion möglich werden wird. Andererseits kann bei Kindern, die ein schlechtes Ansprechen auf die Therapie zeigen, durch eine intensivere Behandlung, wie die SZT, die Prognose verbessert werden. Erste Ergebnisse über die prognostische Bedeutung von MRD vor und nach einer allogenen SZT wurden bereits publiziert.^{188,189}

3.2.1 Quantitative Bestimmung der Leukämiezelllast

Zwei Verfahren, die immunologischen und die molekulargenetischen, können zur quantitativen Bestimmung der leukämischen Resterkrankung verwendet werden. Die konventionelle zytologische Knochenmarkanalyse, deren Vorteil sowohl in der Schnelligkeit der Bestimmung der hämatologischen Remission als auch in den Kosten liegt, kann bestenfalls 3-5 % leukämische Blasten in einem ansonsten normalen Knochenmark nachweisen. Immunologische, durchflusszytometrische Techniken basieren auf dem Vorhandensein von Antigenkombinationen auf der Zelloberfläche und können je nach analysierter Zellzahl eine Leukämiezelle unter 10^{3-4} normalen Zellen detektieren.^{16,190,191} Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ermöglicht die Amplifikation leukämiespezifischer mRNA-

Sequenzen von Leukämiezellen, die durch die Fusion von Genen bei den nicht-zufälligen genetischen Translokationen entstehen (s. Abbildung 3 und Abbildung 4) und den Nachweis von einer unter 10^5 normalen Zellen gestatten.^{178,182,192}

Viele ALL weisen jedoch keine rekurrenten chromosomalen Translokationen mit daraus resultierenden Fusionstranskripten auf (s. Abbildung 3 und Abbildung 4 sowie Abschnitt 2.4). Dennoch können bei den meisten ALL klonale DNA-Marker durch die Untersuchung der spezifischen Genumlagerungssequenzen (*rearrangement*) der *TZR*- und/oder *Ig*- Genloci identifiziert werden.¹⁹³ Diese klonalen Genumlagerungen können durch standardisierte Einfach-PCR oder durch, wie von uns für den *TZR- δ* ³³ und *TZR- γ* etabliert, Multiplex-PCR nachgewiesen werden. Ihr Einsatz zur Bestimmung der residuellen Leukämiezelllast ist jedoch mit erheblichen Kosten an Zeit, Material und Personal verbunden. Der Nachweis von einer Leukämiezelle unter 10^5 normalen Zellen ist möglich.

In den vergangenen Jahren hat sich die Durchflusszytometrie mit dem Nachweis von leukämieassoziierten Oberflächenmarkern durch spezifische Antikörper als weitere sehr sensitive Methode zum Nachweis von MRD erwiesen.^{16,190,194}

3.2.2 MRD-Studien bei ALL im Kindesalter

3.2.2.1 MRD-Studie bei ALL-Ersterkrankungen

Die Signifikanz von MRD-Analysen bei ALL-Ersterkrankung wurde durch drei große, voneinander unabhängige, vor vier Jahren publizierte Studien belegt.¹⁴⁻¹⁶ In diesen prospektiven Multizenterstudien wurde das Rezidivrisiko innerhalb einer Gruppe von Kindern mit ALL, deren klinische und genetische Risikoeigenschaften einheitlich waren, durch die quantitativen MRD-Bestimmungen am zuverlässigsten bestimmt. Das wesentliche Ergebnis der Studie der internationalen BFM-Studiengruppe (I-BFM-SG)¹⁵ ergab sich aus der kombinierten Bewertung der MRD-Befunde von Tag 33, Protokoll I, und Tag 78 (vor Protokoll M). Nach einer minimalen 7jährigen Beobachtungszeit beträgt die pEFS von Kindern mit MRD-Negativität zu beiden Zeitpunkten 0.98 (± 0.02). Kinder mit einer Leukämiezelllast zwischen $<10^{-3}$ und MRD-negativ bzw. $\geq 10^{-3}$ haben jeweils eine pEFS von 0.76 (± 0.02) bzw. 0.16 (± 0.08).

Als vorrangige Erkenntnisse dieser MRD-Studie lassen sich vier Punkte hervorheben: 1. Das Rezidivrisiko lässt sich durch die MRD-Analyse (molekulare Remission) im Vergleich zu konventionellen Risikofaktoren am zuverlässigsten bestimmen und stellt einen bedeutenden

unabhängigen prognostischen Faktor dar; 2. eine große Patientengruppe (40 %) mit geringem Risiko des Therapieversagens kann durch die schnelle Beseitigung von MRD definiert werden; 3. die MRD-definierte Hochrisikogruppe ist größer als die durch andere Risikokriterien bestimmte (15 %); 4. Das MRD-basierte Stratifizierungssystem ist nicht fehlerfrei, denn die Hälfte der Rezidive stammt aus der mittleren Risikogruppe mit einer pEFS von 75 %.¹⁹⁵

Als Konsequenz orientiert sich die Risikostratifizierung in der Erstbehandlungsstudie ALL-BFM 2000 an der *in vivo* Sensitivität der individuellen Leukämie gegenüber der Prednison-Vorphase und der Induktionstherapie (Protokoll I), die nur noch durch die Molekulargenetik (Fusionstranskripte) ergänzt wird. Bis auf bestimmte chromosomale Translokationen werden die bisherigen Risiko- bzw. Stratifizierungsfaktoren nicht mehr zur Stratifizierung herangezogen. Standardrisiko-Patienten werden entsprechend dem guten Ansprechen auf die Therapie definiert (PGR, MRD negativ). Im Gegensatz hierzu sind Hochrisikopatienten durch ihr schlechtes Ansprechen auf die Therapie sowie durch bestimmte genetische Charakteristika gekennzeichnet (PPR, keine komplette Remission nach der Induktionsphase, hohe MRD-Werte, *MLL-AF4⁺/BCR-ABL⁺*) (s. Tabelle 1).

3.2.2.2 Klinische Signifikanz von MRD-Analysen bei ALL-Rezidiven

Die Bedeutung der molekulargenetischen MRD-Untersuchungen bei ALL-Rezidiven im Kindesalter wurde durch Eckert et al.²² aus unserer Arbeitsgruppe in einer retrospektiven Analyse eines homogenen Patientenkollektivs, die aufgrund konventioneller Risikofaktoren beim Rezidiv einheitlich in die S2-Gruppe der Rezidivstudie ALL-REZ BFM 96 stratifiziert wurden, bestimmt (s. Abschnitt 2.1.1.2 und Tabelle 2). Patienten mit einer Leukämiezelllast $< 10^{-3}$ vor dem 3. Behandlungsblock (Tag 35) hatten eine ausgezeichnete Prognose (pEFS 88 %) im Vergleich zu denen mit einer Leukämiezelllast $> 10^{-3}$ (pEFS 20 %). Eine prognostisch eindeutige, und damit auch therapeutisch entscheidende, Auftrennung der heterogenen ALL-REZ BFM Stratifizierungsgruppe S2 scheint durch diese Untersuchungen möglich zu sein. Basierend auf diesen Daten²² und mittlerweile weiterer prospektiv erhobener Daten zur Relevanz von MRD bei Kindern mit ALL-Rezidiv werden die MRD-Kriterien zur Risikostratifizierung und Therapiesteuerung in der neuen Therapieoptimierungsstudie ALL-REZ BFM Pilot 2002²¹ mit herangezogen.

In zukünftigen Rezidivstudien der BFM-Gruppe ist jedoch zu berücksichtigen, dass sich die Entität der Patienten, die ein Rezidiv erleiden, durch die MRD-gesteuerte Therapiestratifizie-

rung bei ALL-Erstbehandlung verändern wird. Während in den ALL-Vorläuferstudien die meisten Rezidiv in den Standard- und mittleren Risikogruppen auftraten (über zwei Drittel), wurden Rezidive in der retrospektiven Analyse der Erstbehandlungsstudie ALL-BFM 90 nach MRD-Stratifizierungskriterien nur in den mittleren und Hochrisikogruppen (jeweils zur Hälfte) beobachtet.¹⁵ Rezidive traten bei MRD-Standardrisikopatienten nicht auf. Im Gegensatz hierzu betrug in der französischen EORTC-Studie die pEFS der MRD-Standardrisikogruppe 80 %.¹⁴ Diese Unterschiede sind wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Sensitivitäts- und damit auch *cut-off* Grenzen, die für die MRD-gesteuerte Stratifizierung festgelegt wurden, zurückzuführen. Es ist anzunehmen, dass Kinder, die ein ALL-Rezidiv erleiden, in Zukunft eine insgesamt höhere Therapieintensität bei Erstbehandlung bereits erhalten haben.

3.2.2.3 Quantifizierung der Leukämiezelllast bei Translokationsleukämien

In den aktuellen Therapieoptimierungsstudien zur Behandlung von Kindern mit einer ALL-Ersterkrankung (ALL-BFM 2000) bzw. mit einem ALL-Erstrezidiv (ALL-REZ BFM Pilot 2002) ist der quantitative Nachweis von MRD ein wesentlicher Bestandteil der molekularbiologischen Diagnostik, der die etablierten klinischen Parameter zur Therapiestratifizierung ergänzt. Die Verwendbarkeit verschiedener molekularer Marker zum MRD-Nachweis, wie klonspezifische *TZR*- und *Ig*-Genrekombinationen und leukämiezellspezifische Fusionsstranskripte *TEL-AML1* und *BCR-ABL* konnten wir und andere Arbeitsgruppen bereits zeigen.^{178,196-200} Zum MRD-Nachweis kamen meist semiquantitative PCR-Techniken zur Anwendung, so auch zum Nachweis des *TEL-AML1*-Fusionsstranskripts,^{162,174,201} bis die *real-time* PCR Technik verfügbar wurde. Diese Methode ermöglicht eine genaue Quantifizierung und so die Bestimmung der exakten Kopienzahl des Zielgens im Versuchsansatz (Abbildung 10). Im Rahmen der Therapiestudien ALL-REZ BFM erheben wir die Relevanz der quantitativen Bestimmung der Fusionsstranskripte *TEL-AML1* und *BCR-ABL*, die molekularen Äquivalente der häufigsten chromosomalen Translokationen bei ALL-Rezidiven, zur sensiblen Beurteilung der Therapie und des klinischen Verlaufs begleitend zur DNA-basierten Amplifizierung klonaler *Ig/TZR* Genrekombination.

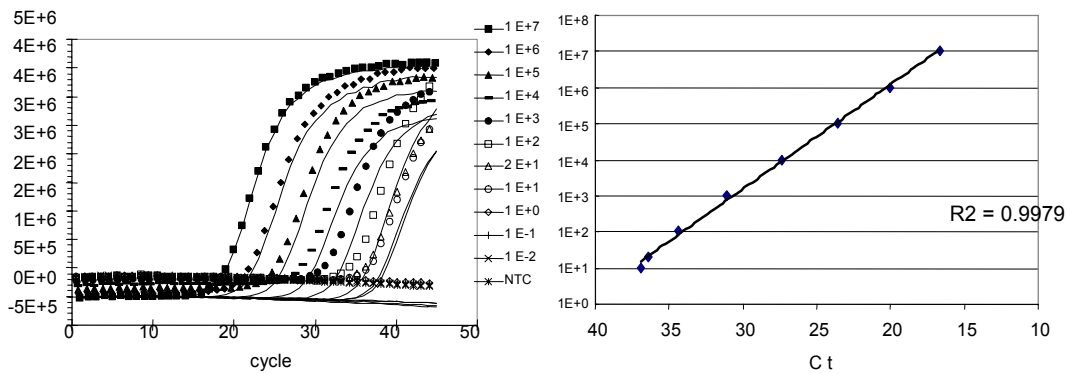


Abbildung 10: real-time PCR Amplifizierungskurven von Null bis 10^7 Kopien von TEL-AML1 DNA und TEL-AML1 Standardkurve (log Kopienzahl vs. threshold cycle (CT)).

Das von uns etablierte Verfahren zum quantitativen Nachweis des *TEL-AML1*-Fusions-transkripts mittels LightCycler *real-time* Technologie ist bisher von keiner anderen Arbeitsgruppe in der Literatur beschrieben. Retrospektiv konnten Proben von 27 Patienten, die zu definierten Zeitpunkten im Verlauf der Therapie eines Rezidivs einer *TEL-AML1*-positiven ALL gewonnen wurden, auf das Vorliegen von leukämischen Restzellen mittels der quantitativen *TEL-AML1 real-time* PCR untersucht werden. Bei 37 der im Verlauf der ALL-Rezidivtherapie von 16 Patienten entnommenen Kontrollknochenmarkproben wurden die Ergebnisse des *TEL-AML1* LightCycler assays mit einer etablierten DNA-basierten MRD-Nachweismethode (LightCycler *real-time* PCR mit *TZR/Ig*-Genrekombinationen als klonsspezifische Marker)²⁰⁰ verglichen. Die Methoden zeigten eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse.

Die Kaplan-Meier Analyse des ereignisfreien Überlebens für die *TEL-AML1*-positiven ALL-Rezidivpatienten, die vor dem 3. Block der Polychemotherapie MRD positiv oder negativ waren (positiv definiert als $\text{MRD} > 10^{-3}$, negativ definiert als $\text{MRD} < 10^{-3}$) ergab einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen zugunsten der zum angegebenen Zeitpunkt MRD negativen Patientengruppe (s. Abbildung 11)

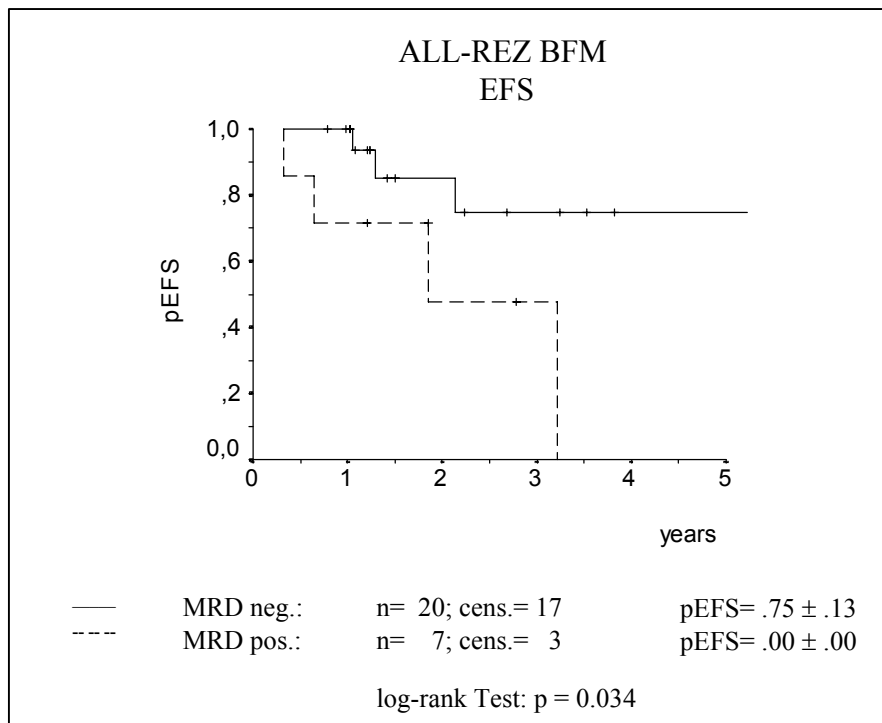


Abbildung 11: Kaplan-Meier Analyse der EFS-Wahrscheinlichkeit von TEL-AML1-positiven ALL-Rezidivpatienten (Stratifizierungsgruppe S2) anhand des Nachweises von MRD vor dem 3. Therapieblock des Protokolls ALL-REZ BFM 96.

3.2.3 Zusammenfassung: Signifikanz von MRD bei ALL-Rezidiven

Die Ergebnisse der MRD-Studien bei Kindern mit ALL-Rezidiv und –Ersterkrnkung lassen sich folgendermaßen zusammenfassen. Das frühe Ansprechen auf die Therapie ist einer der wichtigsten prognostischen Faktoren bei dieser Erkrankungen. Bei Kindern mit einer Leukämie ist die MRD-Bestimmung mit hoch-sensitiven und spezifischen quantitativen Methoden fähig, die individuelle Therapieantwort von jedem einzelnen Patienten zu erfassen. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass bei Kindern mit ALL-Rezidiv, das Ausmaß der biologischen Reaktion der Leukämiezellen auf die Therapie eine frühe Aussage über die Heilungschancen erlaubt und damit einen zuverlässigen Parameter für Therapieentscheidungen liefert. Patienten, die ihre residuellen Leukämiezellen rasch verlieren, haben exzellente Heilungschancen durch eine alleinige Chemotherapie (in Kombination mit präventiver Schädelbestrahlung). Folglich sind bei diesen Patienten keine therapeutischen Ansätze indiziert, die mit einer höheren Morbiditäts- und Mortalitätsrate verbunden sind. Ob intensivere Maßnahmen für Patienten nützlich sind, die nur eine langsame Reduktion ihrer Leukämiezellen zeigen, bleibt derzeit

ungeklärt. Sequentielle prospektive MRD-Untersuchungen im Verlauf der Therapie könnten wichtige therapeutische Entscheidungshilfe liefern, die akuten Toxizitäten und Spätfolgen zu minimieren. Aufbauend auf diesen publizierten und weiteren prospektiv erhobenen Ergebnissen werden die MRD-Kriterien zur Therapiestratifizierung im aktuellen Therapieoptimierungsprotokoll ALL-REZ BFM Pilot 2002 genutzt.²¹

3.2.4 Publikationen zum Projekt 2

1. **Seeger K**, Taube T, Eckert C, Hanel C, Pogodda M, Henze G:
Unusual T-cell receptor- δ gene rearrangement patterns revealed by screening of a large series of childhood acute lymphoblastic leukemia by multiplex PCR. ***Brit J Haematol*** 113:318-22 (2001)
2. **Seeger K**, Kreuzer KA, Lass U, Taube T, Buchwald D, Eckert C, Körner G, Schmidt CA, Henze G:
Molecular quantification of response to therapy and remission status in *TEL-AML1* positive childhood ALL by real-time RT-PCR. ***Cancer Res*** 61:1501-1506 (2001)
3. **Seeger K**, Viehmann S, Buchwald D, Harbott J, Schrappe M, Stary J, Henze G, Trka J:
Treatment response and residual-disease monitoring in initial and relapsed *TEL-AML1* positive childhood ALL. ***Leukemia*** 15:280-82 2001
4. Eckert C, Biondi A, **Seeger K**, Cazzaniga G, Hartmann R, Pogodda M, Proba J, Henze G:
Prognostic value of minimal residual disease in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. ***Lancet*** 358:1239-41 (2001)
5. Eckert C, Landt O, Taube T, **Seeger K**, Beyermann B, Proba J, Henze G:
Potential of LightCycler technology for quantification of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. ***Leukemia*** 14:316-23 (2000)

3.3 PROJEKT 3: DNA-DOPPELSTRANGBRUCH-REPARATUR

3.3.1 DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur

DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) entstehen nicht nur durch exogene Einflüsse sondern auch durch zelluläre Prozesse und während spezieller Rekombinationsvorgänge. Zur Vermeidung destruktiver Folgen einer DNA-Schädigung haben Zellen einige Schutzmechanismen entwickelt. Bei einer ausgeprägten DNA-Schädigung können Zellen in einem Stadium des Wachstumsarrests (Replikationstod) verharren oder sie können einen programmierten Zelltod (Apoptose) einleiten. Ein alternativer Schutzmechanismus wird durch die Wechselbeziehung zwischen Zellzykluskontrollpunkten und DNA-Reparatur bewirkt. Nach einer DNA-Schädigung können Zellen Zellzykluskontrollpunkte vor der Replikation des Genoms, während der Replikation oder der Chromosomentrennung aktivieren. Die DNA-Integrität wird während des Zellzyklusarrests durch DNA-Reparaturmechanismen wiederhergestellt. Die Reparaturgenauigkeit ist letztendlich für das Schicksal der Zellen verantwortlich. Ungenaue Korrekturen können Mutationen und/oder chromosomale Veränderungen (Genominstabilität) verursachen. Für die Genese maligner Erkrankungen sind vor allem zwei Formen der Genominstabilität ausschlaggebend. Während die Mutationsinstabilität durch Punktmutationen oder kleine Deletionen charakterisiert ist (assoziiert mit *mismatch* Reparaturdefekten), zeichnet sich die chromosomale Instabilität durch große Chromosomenrekombinationen mit einschneidenden Auswirkungen auf das Differenzierungs- und Proliferationsprogramm der Zellen aus (s. Abschnitte 2.3 und 3.1.2.)

3.3.2 Mutationen im *NBS1*-Gen

Beim Menschen sind drei autosomal-rezessive Erkrankungen bekannt, die durch ihre große Empfindlichkeit gegenüber ionisierenden Strahlen in Verbindung mit einer Immundefizienz und einem stark erhöhten Risiko für Neoplasien des lymphatischen Systems gekennzeichnet sind: Die Ataxia telangiektasia (AT)²⁰² und die ATLD (*AT-like Disorder*)²⁰³ sowie das *Nijmegen Breakage Syndrom* (NBS).^{204,205} In zellbiologischer Hinsicht besteht eine weitgehende Übereinstimmung: Die Zellen weisen eine besondere Empfindlichkeit gegenüber ionisierenden Strahlen auf und eine Störung grundlegender Prozesse wie der Zellzykluskontrolle und der DNA-Reparatur.²⁰⁶

Im Falle des *NBS1*-Gens konnte der direkte Beweis geliefert werden, dass das Genprodukt, Nibrin, Teil eines Proteinkomplexes ist, der direkt in die DSB-Reparatur und auch in bestimmte Rekombinationsprozesse einbezogen ist.^{204,205} Dazu zählen auch das Protein des *hMRE11*-Gens, dessen Mutation zur ALTD führt, sowie das hRAD50-Protein. Das ATM (AT mutierte) Genprodukt, eine Serin/Threoninkinase, interagiert mit diesem Proteinkomplex und phosphoryliert Nibrin.^{207,208} Des Weiteren ist es in weiteren Prozesse wie die Apoptose und Zellzykluskontrolle involviert.^{209,210} ATM und Nibrin sind folglich sequentielle Komponenten eines S-Phasekontrollpunktes, der nach DNA-Schädigung durch ionisierende Strahlen einen S-Phasearrest bewirkt. In AT- oder NBS-Zellen ist dieser Kontrollpunkt nicht funktionsfähig, wodurch es zur DNA-Synthese bei gleichzeitig vorhandenem DNA-Schaden kommt (Anmerkung: ATM werden Funktionen in verschiedenen Kontrollpunkten zugeschrieben: G1-Arrest durch Regulierung der p53-Phosphorylierung; S-Phasearrest durch NBS1-Phosphorylierung; G2/M-Inhibition durch Interaktion mit hChk2-Kinase). Die Funktion beider Proteine im gleichen Prozess erklärt die phänotypischen Ähnlichkeiten beider Erkrankungen. Mit einem Defekt in diesem Gen kann so das komplexe klinische Bild beim NBS aus Immundefizienz und Gonadendysgenese, erhöhter spontaner und strahleninduzierter Chromosomenbrüchigkeit verständlich gemacht werden.²¹¹

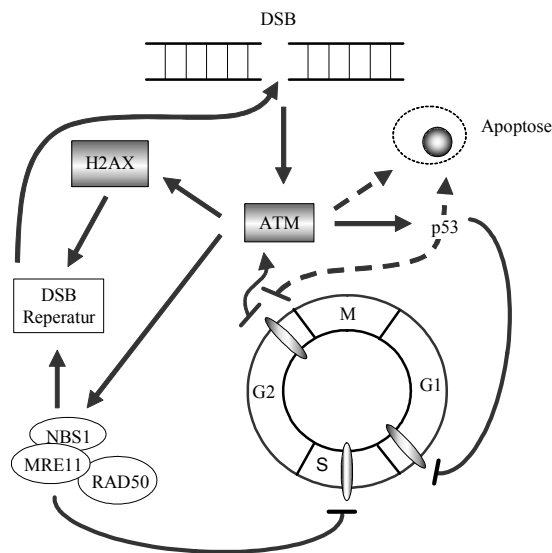


Abbildung 12: Nibrin (NBS1-Protein), DNA-Doppelstrangreparatur und Zellzykluskontrollpunkte

Von besonderer Bedeutung ist, dass DSB physiologischerweise bei den Rekombinationsprozessen der Meiose sowie den Umbauten der TZR- und Ig-Genen der unreifen T- und B-Zellen eintreten und die genannten Gene hierbei involviert sind.^{210,212} Erwähnenswert ist zudem,

dass sowohl biallelisch mutierte $NBS1^{m/m}$ -²¹³ als auch $ATM^{-/-}$ *knockout*-Mäuse^{206,214} an Lymphomen erkranken und zugrunde gehen. Damit könnte im Prinzip erklärt werden, weshalb die AT-, ATLD- und NBS1-Patienten gerade ein so hohes Risiko für Lymphome und Leukämien der B- und T-Zellreihe entwickeln: Die spontan auftretenden DSB in diesen Zellen werden nur fehlerhaft bzw. unvollständig behoben, was in Verbindung mit der ebenfalls gestörten (verzögerten) Einleitung der Apoptose, das hohe Krebsrisiko bedingt.^{210,213} Bisher konnten in der N-terminalen Region von Nibrin zwei Domänen nachgewiesen werden, FHA und BRCT.²⁰⁴ Beide Domänen sind in einer Reihe von anderen Proteinen vorhanden, die an der Zellzykluskontrolle beteiligt sind. Auf der Basis von epidemiologischen Daten wird ein erhöhtes Malignomrisiko bei NBS-Heterozygoten angenommen. Das Risiko ähnelt dem von ATM und weiteren Syndromen, die mit einer Immundefizienz assoziiert sind.²¹²

Bei T-prolymphatischen Leukämien (T-PLL) wurden in der Mehrzahl der Fälle Deletionen des *ATM*-Gens als somatische Mutationen gefunden, wobei die nicht deletierte Kopie des *ATM*-Gens häufig missense Mutationen aufwies.^{215,216} Diese Befunde legen nahe, dass das *ATM*-Gen in T-PLL als Tumorsuppressorgen fungiert. Im Fall der B-CLL hingegen fanden sich auch zahlreiche Fälle, bei denen nur das eine Allel von einer Punktmutation betroffen war und daher Haploinsuffizienz bzw. ein dominant-negativer Effekt als pathogenetischer Mechanismus infrage kommt.^{217,218} Kürzlich konnten wir die Bedeutung von missense Mutationen im *NBS1*-Gen für die ALL zeigen.²¹⁹ Wie bei dem *ATM*-Gen scheinen Null-Mutationen hierbei von untergeordneter Bedeutung zu sein, da die häufigste NBS1-Mutation, 657DEL5, nicht gehäuft im Mammacarcinom²²⁰ oder Non-Hodgkin Lymphom vorkommt.^{221,222} Diese Befunde sprechen dafür, dass insbesondere missense Mutationen in den *ATM*-, *NBS1*-, *hMRE11*- und *hRAD50*-Genen eine wichtige Rolle in der Tumorgenese von lymphatischen Geweben spielen.

3.3.2.1 *NBS1*-Mutationen bei ALL-Rezidiven

Im vorliegenden Kontext ist von besonderer Bedeutung, dass wir 4 neue missense Mutationen im *NBS1*-Gen bei insgesamt 7 der 47 KM-Proben von Kindern mit ALL-Erstrezidiv fanden (5/42 BVZ-ALL; 2/5 T-ALL).²¹⁹ Alle Mutationen führen zu einem Aminosäureaustausch im Nibrin-Protein: S93L (1), D95N (1), I171V (4), R215W(1). Die letztgenannte Mutation wurde auch in einer populationsbasierten Studie von neun Gesunden slawischer Abstammung ge-

funden, die zur Bestimmung der Frequenz der *NBS1*-Hauptmutation 657del5 durchgeführt wurde. Unklar ist, ob dieser Austausch eine prädisponierende Mutation oder eine seltene Sequenzvariante darstellt. Bei vier Patienten konnte der heterozygote konstitutionelle *NBS1*-Genotyp in normalen Blutzellen bestätigt werden. Hingegen konnte bei einem Patienten die D95N-Mutation nicht in dessen normalen Zellen gefunden werden, so dass diese *de novo* in seinen Leukämiezellen entstanden sein muss.

Drei der hier gefundenen Aminosäuresubstitutionen sind von besonderem Interesse. Diese liegen in den zwei bisher bekannten Nibrindomänen (S93L und D95N in FHA; I171V in BRCT), die für die Protein-Protein-Interaktionen und damit für die Nibrinfunktion verantwortlich sind. Die Substitutionen D95N und I171V betreffen außerdem Aminosäuren, die bekanntlich bei Proteinen mit FHA- und BRCT-Domänen konserviert sind.^{223,224} Im Unterschied zu allen bisher bei *NBS1*-beschriebenen Mutationen, die zu einer Verkürzung des Proteins führen und distal der FHA-/ BRCT-Domänen auftreten,²⁰⁴ sind alle in unserer Studie über ALL-Rezidive beobachteten Veränderungen Punktmutationen. Nichtsdestotrotz könnten einige Nibrinfunktionen durch diese Punktmutationen inaktiviert werden. ATM-Patienten haben meistens ebenfalls trunkierende Mutationen.²²⁵ Im Gegensatz hierzu sind die meisten ATM-Mutationen, die bei Patienten mit B-CLL, T-PLL oder Mamma carcinom nachgewiesen wurden, missense Mutationen.^{217,226,227} Angesichts der hohen Inzidenz von *NBS1*-Mutationen bei ALL-Rezidiven untersuchen wir gegenwärtig größere Patientenkollektive auch bei ALL-Ersterkrankungen. Bisher konnten weitere wie z.B. die heterozygoten Mutationen 657del5 und V210F gefunden werden (Keimbahn- bzw. somatische Mutationen).

Diese neuen *NBS1*-Punktmutationen sowie die trunkierende Mutation in Verbindung mit der möglichen Funktion von Nibrin legt die Annahme nahe, dass das *NBS1*-Gen einen Suszeptibilitätsfaktor darstellt und an der Pathogenese der ALL beteiligt sein könnte. Ein möglicher Mechanismus, der die Inaktivierung des *NBS1*-Gens bewirkt, könnte ein dominant-negativer Effekt der missense Mutation sein. Folgerichtig sollten Träger von mutanten *NBS1*-Allelen eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit aufweisen und ionisierende Strahlen vermeiden. Dies hätte einschneidende Auswirkungen auf die Therapiewahl, und die Protokolle zur Behandlung der neoplastischen Erkrankung müssten entsprechend modifiziert werden.

3.3.3 Zusammenfassung: *NBS1*-Mutationen bei ALL-Rezidiven

Das bislang größte bekannte Risiko, Neoplasien des lymphatischen Systems zu entwickeln, weisen Patienten mit Mutationen in solchen Genen auf, die mittel- oder unmittelbar in die Reparatur von DSB einbezogen sind. Damit einher geht eine Immundefizienz und Chromosomeninstabilität sowie eine besondere Empfindlichkeit gegenüber ionisierenden Strahlen. Die derzeit wichtigsten dieser Gene sind *NBS1*, *ATM* und *MRE11*. Inzwischen gibt es erste, überzeugende Belege, dass auch somatische Mutationen in diesen Genen eine wichtige Rolle in der Genese bestimmter maligner Erkrankungen spielen. Dies wird durch die hier gefundene hohe Inzidenz von (neu entdeckten) Mutationen im *NBS1*-Gen in Proben von Kindern mit ALL-Rezidiv untermauert. Als Konsequenz müssten wegen der potentiell erhöhten Strahlenempfindlichkeit bestimmter *NBS1*-Genotypen therapeutische Konzepte, die Strahlentherapieelemente beinhalten, modifiziert werden.

3.3.4 Publikationen zum Projekt 3

1. Varon R, Reis A, Henze G, Graf v. Einsiedel H, Sperling K, **Seeger K**:
Mutations in the Nijmegen breakage syndrome gene (NBS1) in childhood acute
lymphoblastic leukemia (ALL). *Cancer Res* 61:3570-72 (2001)

3.4 PROJEKT 4: ZELLYKLUS, ZELLYKLUSKONTROLLE

Der Zellzyklus wird durch sequentielle Aktivierung und Inaktivierung von Proteinkinasen kontrolliert, die als zyklinabhängige Kinasen (*cyclin-dependent kinase*, CDK) bezeichnet werden (s. Übersichtsarbeit¹²⁸). Jede CDK liegt assoziiert mit einer Zyklin genannten Untereinheit vor, welche essentiell für die katalytische Aktivität und Substraterkennung ist. Unter den Mitgliedern der Zyklinfamilie wurde Zyklin D1 als ein Onkogen und als wahrscheinlicher Effektor mitogeninduzierter Proliferation in der G₁-Phase des Zellzyklus identifiziert. Die Haupt-CDK-Bindungspartner von Zyklin D1 sind die eng verwandten CDK4 und CDK6.¹²⁸ Die Aktivität dieser Kinasen wird auf mehreren Ebenen reguliert, vor allem aber durch Assoziation mit inhibitorischen Untereinheiten, den so genannten zyklinabhängigen Kinaseinhibitoren (*cyclin-dependent kinase inhibitors*; CDKI). Einer dieser Inhibitoren, p16^{INK4a} (INK4; *inhibitor of CDK4*), wurde zuerst als ein CDK4-assoziiertes Protein in menschlichen Zellen gefunden und im Folgenden als ein spezifischer Inhibitor der CDK4-6/Zyklin-D-Kinasen charakterisiert.^{228,229} Seitdem sind drei weitere Mitglieder der INK4-Familie identifiziert worden (p15^{INK4b}, p18^{INK4c} und p19^{ARF/INK4d}).²³⁰⁻²³²

Das Substrat der CDK4-6/Zyklin D-Kinasen ist das Retinoblastomprotein (pRB) (s. Übersichtsarbeiten^{128,233}). Es wirkt hemmend auf die Passage von der G₁- zur S-Phase des Zellzyklus, indem es notwendige TF für den G₁/S-Übergang (vor allem die der E2F-Familie) bindet und damit deren Aktivität unterdrückt. Die Komplexe von pRB-Familienmitgliedern mit verschiedenen E2F-TF bewirken aktiv die Suppression der Genexpression verschiedener Gene durch Rekrutierung von HDAC und von anderen chromatinremodulierenden Faktoren an E2F-abhängigen Promotoren.^{234,235} Die exakte Abfolge ist mindestens in Teilen auch zelltypspezifisch. Es wird jedoch gemeinhin angenommen, dass die D-Zykline zusammen mit CDK4 oder CDK6 die initiale Phosphorylierung ihrer Zielproteine auslösen (u.a. die Pocketproteine pRB, p107 und p130). Später in der G₁-Phase tragen Zyklin E/CDK2- und am G₁/S-Übergang auch Zyklin A/CDK2-Komplexe mit zur pRB-Phosphorylierung bei. Die pRB-Phosphorylierung durch CDK4-6/Zyklin D-Kinasen hebt dessen Assoziation mit E2F und HDAC auf (s. a. Abschnitt 3.1).^{236,237} Die E2F- und andere mit pRB-assoziierte TF werden freigesetzt und die E2F-abhängige Genexpression wird ermöglicht. Die E2F-TF regulieren zur DNA-Replikation notwendige Gene (u. a. Enzyme zur DNA-Metabolisierung und – Synthese; Bildung von Zyklin E /- A). Die G₂-Phase wird offenbar von der Aktivität der

Zykline A und B mit CDK1 als Partner dominiert. Eine Aktivierungskaskade, die Zyklin B/CDK1 beinhaltet, leitet schließlich den Beginn der Mitosephase ein.²³⁸

Die hypophosphorylierten Formen der pRB-Familienmitglieder blockieren somit den S1-Übergang durch die Hemmung des E2F-Transkriptionsprogramms. Die Phosphorylierung von pRB beginnt während der G1-Phase, erreicht ihr Maximum am sogenannten G1-Phase-Restriktions-Punkt (G1/R-Punkt) und hält bis zum Ende der M-Phase an. Der Phosphorylierungsgrad von pRB am G1/R-Punkt, entscheidend für die S-Phaseprogression der Zellen, wird durch p15 und p16 indirekt erniedrigt. Diese inhibieren die Bindung von Zyklin D an CDK4 und damit die Phosphorylierung von pRB.

3.4.1 Regulation des Zellzyklus

Externe und interne wachstumsfördernde und –inhibierende Signale werden in der G₁-Phase integriert. Die transkriptionelle Induzierung sowohl der Zykline und CDK als auch posttranslationelle Modifikation dieser Moleküle sind entscheidend für das Voranschreiten des Zellzyklus. Zyklin/CDK-Komplexe werden auf verschiedenen Wegen aktiviert: CDK benötigen sowohl die spezifische Phosphorylierung durch einen anderen Zyklin/CDK-Komplex^{128,233} als auch die Dephosphorylierung durch spezifische Phosphatasen.²³⁹ Als Zellzyklusbremsen wirken hingegen zwei Klassen von Proteinen, die beide Zyklin/CDK-Komplexe inhibieren können: die Cip/Kip-Familie von CDK-Inhibitoren, bestehend aus p21^{CIP1}, p27^{KIP1} und p57^{Kip2} und die CDK-Inhibitoren der INK4-Familie.

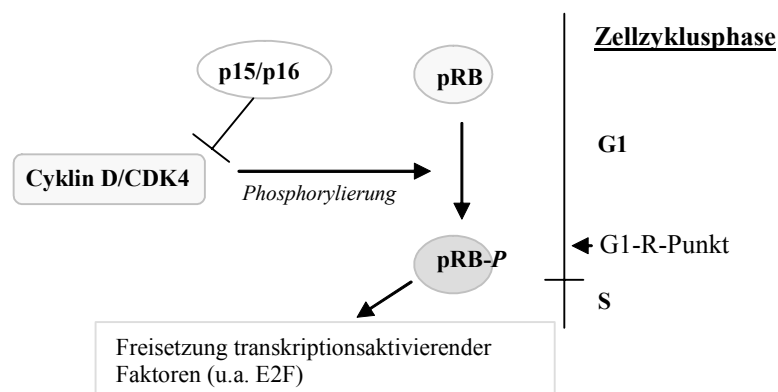


Abbildung 13: G₁-Zellzykluskontrolle durch D-Zykline, INK4-CDKI's und pRB. Die CDKI's p15^{INK4b} und p16^{INK4a} binden an CDK4 und verdrängen dadurch Zyklin D aus der Bindung. Damit wird die Phosphorylierung von pRB verhindert. Der Phosphorylierungszustand von pRB am G1-R-Punkt ist entscheidend für die Progression der Zelle in Richtung S-Phase.

3.4.2 Die Tumorsuppressorproteine p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p19^{INK4d}

Vier INK4-Proteine (p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c}, p19^{INK4d}) inhibieren spezifisch die Aktivität der Zyklin-D-abhängigen Kinasen und verhindern damit die Proteinphosphorylierung der RB-Familie.²⁴⁰ Das für p15^{INK4b} kodierende Gen *INK4b* bzw. *MTS2* (*multiple tumor suppressor 2*) besteht aus zwei Exons (Chromosoms 9; 9p21). In dieser Region treten bei ALL und zahlreichen anderen Tumoren häufig chromosomale Inversionen, Translokationen, Heterozygotieverlust (*loss of heterozygosity*, LOH) und biallelische Deletionen auf.²⁴¹

Der p16^{INK4a}-Genort, unmittelbar neben dem p15^{INK4b}-Gen gelegen, kodiert zusätzlich noch für ein anderes Protein, genannt p19^{ARF/INK4d} (ARF = *alternative reading frame*).²⁴² Dieses besitzt einen anderen Promotor, ein anderes Exon 1 (Exon 1β) als p16^{INK4a} und ein anderes Leseraster. Bereits bekannt ist eine ubiquitäre Expression des *ARF*-Transkripts, im Gegensatz zu einer eher gewebespezifischen bei p16^{INK4a}; p19^{ARF} induziert (ebenso wie p16^{INK4a} und p15^{INK4b}) in p16^{INK4a}-defizienten Zellen einen nahezu kompletten G1-Arrest, ohne jedoch an einen der bekannten Zyklin/CDK-Komplexe zu binden.²⁴³ Die Rolle von p19^{ARF} liegt im p53-Signalweg des Zellzyklus; es stabilisiert p53, indem es an mdm2, ein Onkoprotein, bindet und dessen Export ins Zytoplasma verhindert, wo mdm2 normalerweise im Komplex mit p53 abgebaut wird.²⁴⁴ Dass kein Mitglied der INK4-Familie essentiell für die Zellzykluskontrolle ist, wird durch die normale Entwicklung von *INK4*^{-/-}-Mäusen erkennbar.²⁴⁰ Jedoch neigen p16^{INK4a}^{-/-} Mäuse dazu, einen Tumor unterschiedlicher Histologie zu entwickeln, vor allem nach Exposition mit chemischen Karzinogenen und radioaktiven Strahlen.²⁴⁵

3.4.2.1 Alterationen des *INK4*-Locus bei ALL im Kindesalter

Durch die Tumorsuppressorproteine p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p19^{ARF} und deren Bindungspartner CDK4 wird eine negative Wachstumskontrolle auf den Zellzyklus ausgeübt. Dieser den Zellzyklus bremsende Mechanismus kann auf dreierlei Weise gestört sein:

- Eine große Anzahl der ALL weisen homozygote Deletionen des p15/p16-Gens (INK4b/a) auf.^{154,246-250} Dies deutet auf eine zentrale Rolle dieser CDKI bei der Entstehung/Progression dieser Erkrankung hin.
- Durch Methylierung des INK4a/b-Promotors, die unter anderem auch bei Leukämien bekannt ist, wird die Transkription des Gens verhindert.
- Aus einer Punktmutation in der p15/p16-bindenden Domäne von CDK4, bei einigen Patienten mit malignem Melanom vorhanden, resultiert die Entkopplung dieses Enzyms von seinen physiologischen Inhibitoren p15 und p16.

Die häufigen Deletionen von *INK4a/b* bei ALL und die Methylierung des *INK4a/b*-Promotors haben somit die gleiche Auswirkung wie die ebenfalls oben beschriebene Punktmutation in der p15/16-bindenden Domäne von CDK4: Sie verursachen durch Wegfall der CDK-Repression eine permanent hohe Konzentration phosphorylierten pRB und somit eine verstärkte Zellproliferation (siehe folgende Abbildung 3). Da durch die homozygote *INK4a/b*-Deletion zwei wichtige negative Zellzyklusregulatoren wegfallen, könnten diese Veränderungen mit einer Erhöhung der Anzahl von leukämischen Zellen in der S-Phase assoziiert sein. In diesem Projekt wurde die Prävalenz und klinische Bedeutung der Deletionen von *INK4a* und *INK4b*, des Methylierungsstatus des *INK4a/b*-Promotors sowie der Punktmutationen und andere genetische Aberrationen in der CDKI-Bindungsdomäne von *CDK4* in Leukämiezell-DNA analysiert. Zuerst sollen die bekannten Ergebnisse bei ALL-Ersterkrankung dargestellt werden.

3.4.2.2 Deletionen des *INK4*-Locus bei ALL im Kindesalter

Die biallelische Deletion ist die mit Abstand häufigste bisher gefundene genetische Abnormalität bei T-ALL-Ersterkrankungen im Kindesalter (bis zu 90 %), wird aber auch bei etwa 30 - 40 % der BVZ-ALL im Kindesalter gefunden.^{154,246-250} Bezüglich einer Korrelation dieser Erkenntnisse mit anderen bekannten prognostisch relevanten Merkmalen liegen widersprüchliche Daten vor. Während einige Arbeiten eine Assoziation von *INK4a/b*-Deletionen mit prognostisch ungünstigen Faktoren (hoher leukämischer Zellmasse/Leukozytenzahl, Karyotypveränderungen, mediastinale Infiltration) fanden,^{247,248} konnten andere dies an einer größeren Anzahl an Patienten nicht bestätigen.^{154,250} Die erwartete Assoziation von *INK4a/b*-Deletionen bei ALL-Ersterkrankungen mit einer schlechten Prognose (niedrigere Fünf-Jahres-Überlebenszeit als Patienten mit nicht-deletierten *INK4a/b*-Allelen) konnte nicht gefunden werden.^{154,250} Dieser scheinbare Widerspruch könnte darin begründet liegen, dass nur ein Mechanismus der *INK4a/b*-Inaktivierung untersucht wurde und damit die gefundenen Inzidenzen möglicherweise nicht alle inaktivierten Allele erfassen.

3.4.2.3 Methylierung des *INK4a/b*-Promotors bei ALL im Kindesalter

De novo Methylierung in den Promotoren bestimmter, normalerweise unmethylierter Gene ist eine der am häufigsten gefundenen Veränderungen in menschlichen Tumoren.²⁵¹ Dieses Phänomen ist eng mit der Transkriptionshemmung des betreffenden Gens assoziiert, wie beispielsweise bei den stark hypermethylierten Genen des inaktiven X-Chromosoms.²⁵² Eine globale *Hypomethylierung* der malignen Genome wird begleitet von einer regionalen *Hypermethylierung*.²⁵³ Der Mechanismus der *INK4a/b*-Inaktivierung durch Promotormethylierung an mehreren Cytosin- und Guanin-reichen Regionen (5'-CpG-islands) ist bei vielen Tumoren und Zelllinien speziell für *INK4a* bekannt.^{254,255} Von den zwei bisher hierzu vorliegenden Untersuchungen zu Leukämien wird von einer Arbeitsgruppe in einem hohen Prozentsatz (50 %) der untersuchten Fälle von AML und ALL im Kindesalter eine *INK4b*-Inaktivierung durch CpG-Methylierung beschrieben, die sich *nicht* auf *INK4a* erstreckte.^{256,257} Die Ergebnisse zum Methylierungsstatus des *INK4a/b*-Promotors in Leukämiezell-DNA von Kindern mit ALL-Rezidiv wurden bisher noch nicht publiziert, sie sind in Abschnitt 3.4.4 zusammengefasst.

3.4.2.4 Zyklinabhängige Kinase CDK4

Die CDK4 ist ein Mitglied einer Familie von Kinasen, die alle jeweils assoziiert an regulatorische Untereinheiten, die sogenannten Zykline, vorliegen. Die zunehmende pRB-Phosphorylierung während der G1-Phase durch einen Komplex aus Zyklin D1 und CDK4 befreit die Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie aus der festen pRB-Bindung. Daraus resultierend üben diese TF ihre wachstumsfördernden Effekte auf verschiedene Zielgene aus, die für die S-Phase benötigt werden. Die CDK-Inhibitoren *INK4a* und *4b* ($p16^{\text{INK4a}}$, $p15^{\text{INK4b}}$) regulieren negativ den G1-Restriktionspunkt durch ihre Bindung an CDK4. Störungen dieser Sequenz von Ereignissen entweder durch *RB*-Genmutationen, Überexpression von Zyklin-D1, Amplifikationen oder Mutationen von *CDK4* oder Inaktivierung der *INK4*-Familie ($p16^{\text{INK4a}}$, $p15^{\text{INK4b}}$, $p19^{\text{ARF}}$) durch submikroskopische biallelische Deletionen sind mit der Tumorgenese assoziiert.

Während, wie in Abschnitt 3.4.3 ausführlich beschrieben, homozygote *INK4*-Deletionen und Hypermethylierungen des Promotors von $p15^{\text{INK4b}}$ die häufigsten inaktivierenden Mutationen dieses Kontrollabschnittes bei ALL sind, wurde der Bedeutung von CDK4-Veränderungen bei ALL im Kindesalter wenig Beachtung geschenkt. Amplifikationen des *CDK4*-Gens sind

in einigen Tumoren, Überexpression von *CDK4* in vielen Tumorzelllinien sowie Punktmutationen in der INK4-bindenden Domäne von CDK4 bei Patienten mit familiärem malignen Melanom bekannt. Mutationen in dieser kritischen Region (Exon 2) resultieren in der Aufhebung der Bindung von $p16^{\text{INK4a}}$ und $p16^{\text{INK4b}}$. Eine $p16^{\text{INK4a}}$ -insensitive *CDK4*-Mutante wurde bei einem Patienten mit sporadischem Melanom entdeckt, die von patienteneigenen zytolytischen T-Lymphozyten erkannt wurde.²⁵⁸

3.4.3 Homozygote $p16^{\text{INK4a}}$ - und p^{INK4b} -Deletionen bei ALL-Rezidiven

Im Unterschied zu den zahlreichen *INK4a/b*-Deletionsanalysen bei ALL-Ersterkrankungen lagen bis vor kurzem keine für Rezidive vor. Zur Bestimmung der Prävalenz und der prognostischen Relevanz von $p16^{\text{INK4a}}$ - und p^{INK4b} -Deletionen beim Rezidiv wurden KM-Proben von 125 Kindern untersucht, die entsprechend den Rezidivprotokollen ALL-REZ BFM 90/96 behandelt wurden.²⁵⁹ Die Prävalenz von homozygoten $p16^{\text{INK4a}}$ - und p^{INK4b} -Deletionen betrug bei den BVZ-Rezidiven ($n = 109$) 35 % und 30 %, bei den T-Zell-Leukämien jeweils 73 % ($p = 0.001$). Die Analysen ergaben eine hoch-signifikante Assoziation zwischen dem Vorliegen von biallelischen Gendeletionen, sowohl von $p16^{\text{INK4a}}$ als auch $p15^{\text{INK4b}}$, und der Dauer der Erstremission sowie dem Immunphänotyp, die beide die wichtigsten prognostischen Determinanten beim Rezidiv darstellen. Die Dauer der Erstremission war signifikant kürzer ($p < 0.01$) bei Patienten mit einer $p16^{\text{INK4a}}$ - oder einer $p15^{\text{INK4b}}$ -Deletion im Vergleich zu denen, die keine Deletion aufwiesen. Weiterhin bestand eine signifikante Assoziation zwischen $p16^{\text{INK4a}}$ -Deletionen und höheren peripheren Blasten- und Leukozytenzahlen ($p = 0.004$). Zwischen den beiden deletionsdefinierten Gruppen konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens festgestellt werden.

Die Prävalenz von homozygoten Deletion bei ALL-Rezidiven ($p16^{\text{INK4a}}$ 35 %, $p15^{\text{INK4b}}$ 30 %) war geringgradig höher als die publizierten bei Ersterkrankungen. Die Prävalenz der *INK4*-Deletionen bei BVZ-ALL variieren jedoch in 9 ALL-Ersterkrankungsstudien zwischen 10 - 20 % und bei T-ALL zwischen 60 - 80 %. Die höhere Prävalenz beim Rezidiv könnte als ein Indikator einer schlechteren Prognose bei ALL-Ersterkrankung interpretiert werden. Alternative könnte dies ebenfalls auf das Auftreten von neuen Deletionen während des Intervalls zwischen Ersterkrankung und Rezidiv zurückzuführen sein.²⁶⁰

Generell gilt, dass sich mit Hilfe der Prävalenzbestimmung von genetischen Veränderung, in diesem Fall von *INK4*-Deletionen, beim ALL-Rezidiv auch indirekt Aussagen über deren

Bedeutung bei der Ersterkrankung machen lassen. Wenn die Prävalenzen beim Rezidiv gleich wären wie bei der Ersterkrankung, könnte man folgern, dass die *INK4*-Deletionen bei der Ersterkrankung keine Bedeutung haben in dem Sinne, dass Patienten mit dieser Alteration eine höhere Rezidivchance hätten (pRFS höher) als diejenigen ohne Deletion. In diesem Fall müssten die Deletionen in der Gruppe der Rezidive einen prozentual höheren Anteil ausmachen als in der Gruppe der Ersterkrankungen. Diese Überlegung bezieht sich streng genommen nur auf die pRFS bei Ersterkrankungen, denn sämtliche frühen- und therapiebedingten Todesfälle in der Ersterkrankungstherapie würden überhaupt nicht erst als Rezidive auftauchen, jedoch einen Einfluss auf die pEFS und die Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit (probability of total survival, pTS) haben. Zusammengefasst prüft man mit der *INK4*-Deletionsprävalenzbestimmung bei ALL-Rezidiven also indirekt auch deren Einfluss auf die pRFS bei ALL-Ersterkrankungen.

Unsere Untersuchungen bestätigen die bei ALL-Ersterkrankungen bekannte Korrelation zwischen T-Zellphänotyp und hohen Leukozytenzahlen sowie *INK4*-Deletion. Zusätzlich fanden wir eine signifikante Assoziation zwischen *INK4*-Deletion und dem wichtigsten ungünstigsten prognostischen Marker, eine kurze Erstremissionsdauer. Interessant ist, dass trotz dieser Deletion kein signifikanter pEFS-Unterschied zwischen der Gruppe mit und der ohne *INK4*-Deletion bestand. Diese Tatsache lässt eine prognostische Bedeutung der *INK4*-Deletionen bei ALL-Rezidiven als sehr unwahrscheinlich erscheinen.

Diese bei Kindern mit ALL-Rezidiv erhobenen Daten könnten möglicherweise die widersprüchlichen Ergebnisse bei ALL-Ersterkrankungen erklären. Patienten mit *INK4*-Deletion neigen dazu, ein Jahr früher ein Rezidiv zu bekommen (Mediane Erstremissionsdauer 2.1 vs. 3 Jahre). Entsprechend könnten die Beobachtungszeiten in einigen Studien zu kurz sein. Dies würde eine Verzerrung der Ergebnisse zu Ungunsten der Patientengruppe mit *INK4*-Deletion bewirken, bei denen mehr Ereignisse auftreten. In den 2 Studien, die eine Korrelation zwischen *INK4*-Deletion und ungünstiger Prognose sahen, war die mediane Beobachtungszeit 3.25 Jahre bzw. wurde nicht angegeben. Hingegen konnte die größte bisher durchgeführte Studie mit 155 ALL-Ersterkrankungen und einer langen Nachbeobachtungszeit von 5 Jahren keinen prognostischen Effekt finden.

Carter et al. berichten ebenfalls über eine Korrelation zwischen *p16^{INK4}*-Deletion und ungünstigem Therapieerfolg bei ALL-Ersterkrankungen im Kindesalter. Aus methodischen und theoretischen Erwägungen wurden in unserer Studie hemizygote *INK4*-Deletionen nicht unter-

sucht.²⁶¹ Theoretisch könnte dies den ungünstigen Einfluss der *INK4*-Deletionen auf die Prognose verdecken, da die potentiell vorhandenen hemizygoten Deletionen der Gruppe ohne Deletionen zugerechnet würden. Heymans et al.²⁴⁷ fanden im Gegensatz zu Carter et al. jedoch keinen pEFS-Unterschied zwischen Patienten mit hemizygot-deletierten und solchen mit Wildtyp-Genotyp.²⁴⁶ Eine Validierung unserer Daten und der von anderen durch eine geeignete Methode (z.B. Fluoreszenz in situ Hybridisierung) wäre sinnvoll. Des Weiteren müssen durch weitere Studien, die immunhistochemische und Methylierungsanalysen einschließen, die alternativen Mechanismen der Inaktivierung des *INK4*-Tumorsuppressorgens zur Klärung der prognostischen Signifikanz dieser häufigsten genetischen Veränderung bei ALL-Ersterkrankung und –Rezidiv im Kindesalter untersucht werden.

3.4.4 *INK4b*-Promotormethylierung

Im Gegensatz zu *INK4b* wird weder in akuten noch in chronischen Leukämien eine *INK4a*-Promotormethylierung gefunden, wohingegen dieser Inaktivierungsmechanismus bei Lymphomen eine wichtigere Rolle zu spielen scheint. Zwischen hoch- und niedrigmalignen NHL und Burkitt-Lymphom bestehen ebenso unterschiedliche Methylierungsmuster beider Gene.²⁵⁶ Bei niedrigmalignen NHL findet sich in nur 9 % eine *INK4a*-Promotor-Hypermethylierung, während hochmaligne NHL zu 85 % diese Aberration aufwiesen ($p < 0,005$).²⁵⁷ Burkitt-Lymphome scheinen in einem hohem Prozentsatz (> 50 %) eine Inaktivierung beider Gene aufzuweisen, sowohl durch homozygote Deletion als auch durch Hypermethylierung beider Gene.²⁵⁷

Bezüglich der ALL im Kindesalter existiert bisher nur eine Arbeit, welche versucht, einen Bezug von *INK4b*-Methylierung zur Prognose der Erkrankung herzustellen.²⁶² Es findet sich eine aberrante Methylierung des untersuchten *INK4b*-Bereiches bei 8 von 21 Patientenproben (38 %). Ein wichtiges Ergebnis ist die offenbare Korrelation von *INK4b*-Methylierung und dem Vorliegen kariotypischer Abnormalitäten. So haben 82 % der Patienten mit unmethylierten *INK4b*-Allelen keine erkennbaren chromosomalen Aberrationen, wohingegen 44 % der Patienten mit methylierten *INK4b*-Allelen prognostisch bedeutsame chromosomale Deletionen, Inversionen oder Translokationen aufweisen. Dies könnte auf eine Wechselbeziehung zwischen fusionsbedingter aberranter Onkogenexpression und dem zugrunde liegenden Ereignis der *INK4b*-Methylierung hindeuten. Die von Wong et al.²⁶² durchgeführte Analyse des

ereignisfreien Überlebens ergab einen Trend in Richtung auf eine niedrigere pEFS jeweils in der Gruppe der Patienten mit *INK4b*-methylierten Blasten.

Prävalenz methylierter Genotypen und Verteilung von Merkmalen bei ALL-Rezidiven

Die KM-Proben von Kindern mit ALL-Erstrezidiv, welche keine homozygote *INK4a/b* Deletion aufwiesen, wurden auf das Vorhandensein methylierter CpG-Inseln in den Promotoren von *INK4b* und *INK4a* untersucht. Bei *INK4a* wurden keine methylierten Allele (wie aus der Literatur bekannt) gefunden. Die Prävalenz methylierter *INK4b*-Promotoren im untersuchten Kollektiv lag bei 16/56 (28 %). Bezüglich der Verteilung diskreter (Zeitpunkt, Ort, Immunphänotyp, Geschlecht) und stetiger Variablen (Blasten-, Leukozytenzahl, Erstremissionsdauer, Alter) bestand kein signifikanter Unterschied (Therapiestudie ALL-REZ BFM) zwischen den Patientenproben mit methyliertem und nicht methyliertem *INK4b*-Promotor. Es lag jedoch ein Übergewicht der prognostisch ungünstigen Merkmale T-Zell-Immunphänotyp (13.5 % vs. 5 %) und sehr früher/früher Rezidivzeitpunkt (56.3 % vs. 32.5 %) in der Patientengruppe mit methyliertem *INK4b*-Promotor vor. Diese leichte Verzerrung könnte auch die im Median deutlich kürzere Erstremissionsdauer (900 vs. 1180 Tage, n.s.) der Gruppe mit methyliertem Genotyp erklären.

Prognostische Bedeutung der *INK4b*-Promotormethylierung

Die 5-Jahres-pEFS der Patientengruppe mit methylierten *INK4b*-Promotoren ($p = 0.24 \pm 0.12$) war im Verhältnis zu den Patienten mit nicht methylierten *INK4b*-Promotoren (0.51 ± 0.09) grenzgradig signifikant niedriger ($p = 0.059$). Diese Differenz ist jedoch signifikant unterschiedlich, wenn die oben genannte Verzerrung in der Verteilung der Patienten behoben wurde. Die Patientengruppe mit methyliertem *INK4b*-Promotor hatte eine statistisch signifikant niedrigere pEFS als die mit *INK4b*-Wildtyp (0.23 ± 0.14 vs. 0.52 ± 0.12 ; $p < 0.05$). In der kombinierten *INK4b*-Deletions-/Methylierungsanalyse ließ sich ebenfalls ein signifikanter pEFS-Unterschied finden (0.35 ± 0.07 vs. 0.49 ± 0.08 ($p=0.0271$)). Somit ist festzustellen, dass Patienten mit deletiertem oder promotormethyliertem *INK4b* in ihren Leukämieblasten eine signifikant geringere 5-Jahres-pEFS als solche mit *INK4b*-Wildtyp haben.²⁶³

Unsere Arbeit ist die einzige, welche Aussagen zu *INK4b*-Methylierung bei ALL mit solchen über die Prognose für die Erkrankung verbindet. Zum heutigen Zeitpunkt ist die Aussage erlaubt, dass es möglicherweise einen Zusammenhang zwischen methylierungsbedingtem Aus-

fall des *INK4b*-Gens und einer schlechteren pEFS zumindest bei Kindern mit erstem ALL-Rezidiv gibt. Es muss jedoch weiteren Studien vorbehalten bleiben, zu klären, ob dieser negative Effekt auf die pEFS alleine durch das Fehlen des p15^{INK4b}-Proteins oder vielmehr durch den zugrunde liegenden Defekt in der Methylierungsmaschinerie des malignen Zellklons verursacht wird. Hierbei sollten zuerst eine größere Anzahl Patientenmaterialien untersucht werden, um die bei kleinen Fallzahlen entstehenden großen Konfidenzintervalle und daraus folgende Unklarheiten der statistischen Aussage zu reduzieren. Damit erhielte man weitere Klarheit über die Relevanz der gefundenen Aberration für die Prognose. Sofern sich hierdurch die in dieser Arbeit aufgezeigte schlechtere Prognose der Patienten mit *INK4b*-methylierten Blasten bestätigt, müsste in der Folge die Hypothese getestet werden, ob bei den leukämischen Klonen dieser Patienten eine Aberration der DNA-Methyltransferasen im Sinne z.B. einer Überexpression vorliegt, welche möglicherweise für diese *INK4b*-Methylierung verantwortlich sein könnte.

3.4.5 Mutationsanalyse der INK4-Bindungsstelle von CDK4 bei ALL

Veränderungen des pRB-Signalwegs spielen sicherlich eine kritische Rolle in der Tumorgenese. Bei ALL-Ersterkrankung und -Rezidiv (s. Abschnitt 3.4.3) sowie anderen lymphoproliferativen B- und T-Zellerkrankungen im Kindesalter stellen die homozygote Deletion der *INK4*-Gene den hauptsächlichen Dysregulationsmechanismus in diesem pRB-Signalweg dar. Ein weiterer Mechanismus wurde von Wölfel et al.²⁵⁸ in Melanomen beschrieben. Eine Mutation in CDK4 bewirkt eine Aufhebung der Bindung der CDK4-Inhibitoren p16^{INK4a} und p15^{INK4b}. Die CDK4-Isoform R24C vermittelt als autosomal-dominantes Onkogen eine erhöhte Melanom-Disposition.²⁶⁴ In unserer Analyse von 102 Kindern mit ALL und 9 hämatologischen Zelllinien konnten wir keine die C817T-Mutation einschließende Veränderung in CDK4-Exon 2 feststellen.²⁶⁵

3.4.6 Publikationen zum Projekt 4

1. v. Einsiedel H, Taube T, Hartmann R, Wellmann S, Seifert G, Henze G, **Seeger K**:
Deletion analysis of p16 INK4a and p15 INK4b in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 99:4629-31 (2002)
2. v. Einsiedel H, Taube T, Hartmann R, Eckert C, Seifert G, Wellmann S,
Henze G, **Seeger K**:
Prognostic value of p16INK4a gene deletions in pediatric acute lymphoblastic leukemia.
Blood 97:4002-4 (2001)
3. v. Einsiedel H, Taube T, Beyermann B, Dragon S, Möricke A, Kebelmann-Betzing C,
Köchling J, Henze G, **Seeger K**:
Absence of Mutations in the CDKI binding site of CDK4 in childhood ALL. *Leuk Lym-
phoma* 40:413-7 (2001)

3.5 PROJEKT 5: ZYTOKINE UND ZYTOKINREZEPTOREN BEI ALL

3.5.1 Zytokin-/Zytokinrezeptoren

Entwicklung und Reifung, Wachstum und Differenzierung, sowie Steuerung der Effektorfunktionen der Zellen des hämatopoetischen und lymphatischen Systems im Organismus unterliegen einer strengen Kontrolle, die koordinierte Interaktionen zwischen einer Vielfalt unterschiedlicher Zellarten, darunter Stromazellen, voraussetzt. Stromazellen sind eine heterogene Zellpopulation, die hauptsächlich aus vier Zelltypen (Fibroblasten, Adipozyten, Endothelzellen, Makrophagen) besteht. Die Interaktionen werden, neben der Informationsweitergabe über direkte Zellkontakte, durch lokal (autokrin/parakrin) oder systemisch wirksame, lösliche Mediatoren, den Zytokinen, vermittelt. Die Bindung von Zytokinen an spezifische Rezeptorketten bedingt spezifische, vom Zelltyp und -differenzierungsgrad abhängige biologische Antworten. Diese umfassen neben der Regulation von Zellwachstum und von Zelldifferenzierungsprozessen auch die Regulation der Adhäsionsmolekül- und Chemokinexpression, die für die Zellmigration der hämatopoetischen Zellen benötigt werden.

Wie bei normalen hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks existieren zwischen Leukämiezelle, immunkompetenter Zelle und Stromazelle Regelkreise, die wesentlich durch Zytokine vermittelt werden. Sowohl das Wachstum als auch das Überleben der Leukämiezellen ist von Wachstumsfaktoren abhängig, die von Stromazellen und/oder direkt von Leukämiezellen selbst erzeugt werden.²⁶⁶ Welche Bedeutung eine erhöhte Expression, aktivierende Zytokin-Mutationen,^{267,268} alternatives mRNA-*splicing*²⁶⁹ oder die konstitutive Aktivierung der Zytokinrezeptoren durch Polymorphismen²⁷⁰ oder Mutationen²⁷¹ in der Leukämogenese haben, ist weitestgehend ungeklärt. Die von Zytokinen bewirkte Suppression oder Förderung des Zellwachstums, -überlebens sowie der Apoptose kann zudem den Therapieerfolg von neoplastischen Erkrankungen beeinflussen.²⁷²

3.5.2 Zytokine und deren Stellenwert in der Tumorimmunologie

Innerhalb der Organisation des lymphatischen Systems übernehmen Zytokine zwei zentrale Funktionen: Zunächst sind sie erforderlich für die Generierung und Entwicklung der lymphatischen Zellen; später wirken sie als Modulatoren der Effektorfunktionen der reifen Zellen und spielen eine zentrale Rolle bei der Auslösung, Fortsetzung und Kontrolle der Immunant-

wort.²⁷³ Aufgrund dieser Eigenschaften sind Zytokine für die Tumorummunologie in zweierlei Hinsicht von Interesse. Zum einen könnte eine übermäßige Zytokinproduktion und/oder Rezeptorexpression eine direkte Rolle in der Genese maligner hämatologischer Erkrankungen spielen: Denkbar erscheint, neben einer entgleisten Wachstumsstimulation leukämischer Zellen selbst, die Möglichkeit eines Versagens der Tumorzellerkennung und -eliminierung infolge einer fehlerhaften Regulation der Immunantwort durch inadäquate Aktivität rezeptortragender Zellen. Zum anderen eröffnen sich mit wachsendem Verständnis der Zusammenhänge der Immunregulation und der Leukämogenese aber auch potentiell neue Therapiemöglichkeiten: Zukunftsweisend erscheint der immunmodulatorische Einsatz der Zytokine mit dem Ziel einer Stimulation der körpereigenen Tumorabwehr oder der Inhibition der Proliferation bzw. Förderung der Apoptose von Leukämiezellen. Vakzinationsversuche nach Transfektion von Zytokingenen in malignen Zelllinien, systemische Applikation von Zytokinen, sowie extrakorporale Zytokininkubation spezifisch reagierender, zytotoxischer T-Zellen und deren anschließender Rücktransfer stellen verschiedene Strategien dar, über den gemeinsamen Mechanismus der T-Zellaktivierung eine wirksame Immunreaktion gegen Tumorzellen auszulösen.²⁷⁴

In diesem Zusammenhang sind die unterschiedlichen Funktionen und Zytokinexpressionsmuster von T-Helfer (Th)-Zellsubpopulationen zu nennen. Th1-Zellen sezernieren IL-2, IFN γ und Lymphotoxin, Th2-Zellen IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13. Th1-Zellen unterstützen die Zellvermittelte Immunität, einschließlich der zytolytischen Reaktionen, Th2-Zellen die antikörpervermittelte Immunität. Im Gegensatz zur aktivierenden Wirkung von Th1-Zytokinen (Erhöhung der Expression von MHC-, kostimulatorischen Molekülen) üben Th2-Zytokine einen starken inhibitorischen Effekt auf die Monozyten/Makrophagen/Dendriten-Funktion aus. So antagonisiert IL-4 den aktivierenden Effekt von IFN γ und IL-10 unterdrückt die Expression der MHC-, kostimulatorischen und Adhäsions-Moleküle.²⁷⁵ Während IL-4 und IL-10 die Apoptose von Monozyten induzieren, erhöht IL-12 deren Überlebensrate.²⁷⁶

3.5.3 Zytokine/Zytokinrezeptor-Expression bei ALL

3.5.3.1 Expressionsanalysen bei ALL-Rezidiven

Zur besseren Charakterisierung der Blasten bei Erstrezidiven von BVZ-ALL wurden die Expressionsmuster von verschiedenen Zytokinen (IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15, IFN- γ , G-

CSFR), Zytokinrezeptoren (IL-4R α , IL-7R α , IL-10R, γ_c -Kette), Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, CD58), und kostimulatorischen Proteinen (CD40, CD40L, B7.1, B7.2, CD28, MHC-I und -II) von Leukämiezellen auf der RNA- als auch der Proteinebene bestimmt.²⁷⁷ Die Analyse wurde initial auf Faktoren fokussiert, von denen eine Rolle in der Entstehung maligner B- und T-Zellen angenommen werden kann. Bekanntlich können die Zytokine IL-2, IL-4, IL-7 und IL-15 eine Proliferation in B-CLL induzieren.²⁷⁸⁻²⁸⁰ IL-15-überexprimierende transgene Mäuse entwickeln eine Leukämie.²⁸¹ Diese Analysen wurden später auf Untersuchungen weiterer hämatopoetischer und lymphatischer Zytokine (IL-12, IL-18, TNF α und TGF β) und von Wachstumsfaktoren/-rezeptoren für Angiogenese und Migration (VEGF, Flt1, KDR; Chemokin/Chemokinrezeptoren: IL-8, mig, CXCR3, CXCR4, CCR5) ausgeweitet.

Die erweiterten Untersuchungen an über hundert Patientenproben bestätigen die starke Genexpressionsvariation der verschiedenen Zytokinen/Zytokinrezeptoren in KM-Leukämiezellen der Kinder mit ALL-Erstrezidiv über mehrere Zehnerpotenzen. Beachtenswerterweise war die Expression der Chemokine/-rezeptoren (IL-8, CXCR3, CXCR4) und von TGF β am stärksten ausgeprägt. Einen zusammenfassenden Überblick der nicht publizierten Expressionsanalysen gibt die folgende Tabelle 7.

Tabelle 7: Zytokin/Zytokinrezeptorexpression in Blasten bei ALL-Erstrezidiven (n= 106; Medianwerte).

Genexpression (Kopien / μ g Gesamt-RNA)			
sehr stark >10 ⁶	stark 10 ⁵ –10 ⁶	mäßig 10 ⁴ –10 ⁵	schwach <10 ⁴
<i>IL-8</i>	<i>IL-10</i>	<i>IL-18</i>	<i>IL-7</i>
<i>CXCR3</i>	<i>IL-7R</i>	<i>IFNγ</i>	<i>IL-12p40</i>
<i>CXCR4</i>	<i>IL-10R</i>	<i>VEGF</i>	<i>IL-15</i>
<i>TGFβ</i>	<i>IL-15R</i>	<i>Flt1</i>	<i>Mig</i>
		<i>CCR5</i>	

3.5.3.1.1 Vergleich von ALL-Rezidiv und -Ersterkrankung

Der Vergleich der Zytokin/Zytokinrezeptorexpressionsstärken von Leukämiezellen zwischen ALL-Ersterkrankung und –Rezidiv ergab signifikante Unterschiede ($p < 0.05$). Während die Expressionsstärke von *IL-10*, *IL-10R*, *CXCR3*, *CXCR4* und *VEGF* in beiden Erkrankungsstadien gleich war, war die von *IL-8* zum Zeitpunkt des Rezidivs signifikant stärker. Die der anderen war hingegen signifikant schwächer. Diese unterschiedlichen Z/ZR-Expressionen zwischen den beiden Erkrankungsstadien könnten im Wesentlichen auf zwei Ursachen zu-

rückzuführen sein. Es ist anzunehmen, dass sich die Zytokinexpression der Leukämiezellen bei ALL im Laufe der malignen Transformation ändert, und die Zellen zunehmend Wachstumsfaktor-unabhängig werden. Diese Hypothese wird durch die geringere Expression von einigen hämatopoetisch bedeutsamen Zytokinen (*IL-7*, *IL-15*, *IL18*, *IFN γ* , *TGF β* , *IL-7R*, *IL-15R*, *Flt1*, *CCR5*) im Rezidivfall gestützt. Besonders deutlich sind diese Unterschiede bei *IL-7R*, welcher 10fach niedriger in den Leukämiezellen beim Rezidiv exprimiert war. Hingegen weist die gleiche Konzentration von anderen Zytokin/Zytokinrezeptortranskripten (*IL-10*, *IL-10R*, *CXCR3*, *CXCR4*, *VEGF*) bei ALL-Ersterkrankungen und –Rezidiven auf ihre unentbehrliche, biologische Relevanz für Überleben und Proliferation der Lymphoblasten hin. Nur *IL-8* war bei ALL-Rezidiven höher exprimiert. In der Literatur findet sich keine Veröffentlichung, die über ähnliche Untersuchungen an Leukämiezellen von Patienten mit ALL-Rezidiven berichtet, bzw. über vergleichende Analysen mit ALL-Ersterkrankungen. Die erhobenen Ergebnisse wurden durch durchflusszytometrische Analysen validiert, die eine Aussage über die gleichzeitige Expression von Zytokin/Zytokinrezeptor auf einer Zelle erlauben.²⁷⁷ Die Funktion der Zytokine, die bei ALL-Rezidiven eine starke Expression zeigten, in der normalen Lymphopoese und Immunantwort sowie ihre potentielle Rolle in der Leukämogenese werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

3.5.3.1.2 *TGF β*

Obwohl *TGF β* in einer Reihe von Untersuchungen unter physiologischen Bedingungen die Proliferation von B-Lymphozyten in der normalen Lymphopoese des Knochenmarks inhibiert und deren Differenzierung induziert,²⁸²⁻²⁸⁴ wurde bereits eine Assoziation zwischen dysregulierter *TGF β* -Expression und B-CLL sowie CML beobachtet. Sowohl B-CLL als auch KM-Stromazellen produzieren konstitutiv mehr *TGF β* als die entsprechenden Zellen von Gesunden.^{285,286} Durch die verstärkte *TGF β* -Produktion könnte über die hierdurch bedingte Inhibition der Zytokinproduktion, z.B. von *IL-1*, *IL-6*, einerseits die normale Hämatopoese gestört sein, andererseits eine humorale Immundefizienz verursacht werden, die bei B-CLL im späten Stadium beobachtet wird.²⁸⁷ Durch autokrine und parakrine Mechanismen wirkt *TGF β* auf die KM-Stromazelle und es findet eine Herunterregulation der Expression von Adhäsionsmolekülen statt.^{288,289} Es ist anzunehmen, dass eine erhöhte *TGF β* -Produktion somit die immunologische Erkennung von Tumorzellen und von Infektionen verschlechtert oder vollständig verhindert.

3.5.3.1.3 IL-10 und dessen Rezeptor

Maligne Zellen entwickeln verschiedene Mechanismen, um der Immunerkennung und –vernichtung zu entgehen. Ein potentieller Mechanismus ist die Produktion von immunsuppressiven Zytokinen wie IL-10 durch die Leukämiezelle selbst. Die Produktion und Sekretion von IL-10 durch maligne Zellen stehen in direktem Zusammenhang mit der fehlenden Erkennung im Immunsystem durch Verminderung der Expression von MHC-, Adhäsions- und kostimulatorischen Molekülen auf der Blastenzelloberfläche sowie auf T-Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen. Für B-Zellen gilt IL-10 als wichtiger Überlebens- und Aktivierungsfaktor.²⁹⁰⁻²⁹² Ebenso wirkt es als autokriner Wachstumsfaktor für die Expansion von neoplastischen B-Zellen in Mäusen.²⁹³

Die Funktion von IL-10 in malignen hämatologischen Erkrankungen wurde vorwiegend in B-CLL und T-Zell-Leukämien untersucht.^{294,295} Bei B-CLL-Zellen, die einen IL-10R konstitutiv exprimieren, bewirkt exogenes IL-10 eine Inhibition der Proliferation, eine Differenzierung und eine Verhinderung der Apoptose.²⁹⁴ IL-10 vermindert, ähnlich wie IFN- γ , den durch Glukorticoide induzierten Zelltod. Unsere Daten lassen eine ähnliche Bedeutung von IL-10 bei rezidierten BVZ-ALL wie bei B-CLL annehmen, da generell eine starke Expression von IL-10 und IL-10R bei einem hohen Anteil der Blasten festgestellt wurde. Wegen der bivalenten Wirkung von IL-10 auf die Apoptose, die zwischen einem schützenden und fördernden Effekt variieren kann, muss jedoch dessen tatsächliche Funktion in der Wachstumskontrolle von Leukämieblasten noch gezeigt werden. Im Gegensatz zu den Untersuchungen bei B-CLL²⁹⁶ konnten wir bei BVZ-ALL-Rezidiven keine Assoziation zwischen IL-10 Genexpression und Prognose feststellen.

3.5.3.1.4 IL-7R

Grundlegende Voraussetzung für eine Zellantwort nach Zytokinstimulation ist die Expression des entsprechenden Rezeptors, die in Abhängigkeit von der spezifischen Entwicklungsphase der Zelle reguliert wird. Aufgrund der starken IL-7R Rezeptorexpression kann spekuliert werden, dass IL-7 eine Rolle bei Proliferation und Überleben der Leukämiezelle spielt.²⁹⁷ Die unterschiedliche Proliferationsantwort humaner BVZ-ALL auf IL-7 scheint im Zusammenhang mit der entsprechenden Rezeptorexpression zu stehen und vom Reifungsstadium der stimulierten Zellen abzuhängen. Die von uns bestimmte *IL-7R α* -Expression unterschiedlicher Stärke in den verschiedenen immunphänotypisch-definierten BZV-ALL-Stadien könnte für das unterschiedliche Ansprechen auf IL-7 verantwortlich sein.²⁹⁸ Eine Differenzierung der ALL-Zelle in normale blutbildende Zellen könnte möglicherweise durch zusätzliche stromaassoziierte Faktoren erreicht werden, welche die ALL-Zelle selber nicht produziert.

3.5.3.1.5 IL-15R

Interleukin-15 ist in vielen seiner stimulatorischen Wirkungen dem IL-2 sehr ähnlich. Beide Zytokine stimulieren zytotoxische T- und B-Zellen mit ähnlicher Potenz. Interleukin-15 hat jedoch im Gegensatz zu IL-2 auch wichtige biologische Funktionen außerhalb des Immunsystems. So ist IL-15 ein anaboler Wachstumsfaktor für Muskelzellen.²⁹⁹ In *in vitro*- und *in vivo*-Studien induzierte IL-15 eine Reihe von Antitumoreffekten, die die Induktion von zytotoxischen T-Zellen (CTL) und lymphokinaktivierten Killerzellen (LAK) einschließen. Andererseits stimuliert IL-15 die Proliferation von B-CLL-Zellen, die über den IL-2R β / γ_c -Komplex vermittelt wird.³⁰⁰ Im Gegensatz zu normalen B-Lymphozyten proliferierten die leukämischen Zellen der Patienten unter IL-15 ohne vorherige Präaktivierung. Interessanterweise wurden ruhende B-CLL Zellen durch IL-2 und steigender IL-15 Konzentration synergistisch stimuliert.³⁰⁰ Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Endothelzellen den IL-15R-Komplex exprimieren und IL-15 die Angiogenese *in vivo* stimuliert.³⁰¹ Die Überexpression von IL-15 in Mäusen führt zur Ausbildung einer Leukämie.²⁸¹ Die Expression des IL-15R α wurde bei vielen Zelllinien beobachtet, unter anderem auf den Zellen verschiedener B-Zell-Lymphome.³⁰² Die Koexpression von IL-15R und dessen Liganden in den Lymphoblasten von Kindern mit ALL lässt vermuten, dass IL-15 auch als Wachstumsfaktor der ALL-Leukämogenese und der Angiogenese über autokrine/parakrine Mechanismen wirkt.

3.5.3.1.6 Immunität von Leukämiezellen bei ALL-Rezidiven

Für die Auslösung und Fortsetzung einer Immunantwort werden drei Phasen der zellulären Interaktion zwischen T-Lymphozyt und tumor- bzw. tumorantigenpräsentierender Zelle durchschritten. Nach der CD2/LFA-1-vermittelten Adhäsion der T-Zelle an den LFA-3/ICAM-1-Rezeptor der APC erfolgt die Antigenerkennung und -bindung durch den TZR CD3/Antigen-MHC-Komplex, die von einer Interaktion der kostimulatorischen Moleküle B7-1, B7-2, CD40 auf der APC mit den T-Zellliganden CD28, CTLA-4 und CD40-L begleitet wird. Tumorzellen können dieser Immunüberwachung durch die Expression bestimmter Zytokine oder durch den Mangel an kostimulatorischen Oberflächenmolekülen bzw. durch die Herunterregulation von MHC-Molekülen entgehen.

Die Leukämiezellen exprimieren auch die zur Antigenpräsentation benötigten Molekülen der MHC Klasse I und II, ³⁰³ wie auch unsere Analysen zeigen.²⁷⁷ Die Expression des CD40-Antigens wird auf den meisten B-Zellneoplasien nachgewiesen.³⁰⁴ Dies wird auch durch unsere Untersuchungen an Blastenpopulation von BVZ-ALL-Rezidiven bestätigt, die eine hohe Expression aufwiesen. Demgegenüber ist die Expression von CD40L meistens auf CD4⁺/CD8⁻-Zell-Lymphomen beschränkt. Sie kann jedoch auf B-CLL^{305,306} und - wie wir zeigen konnten – mehrheitlich auch auf leukämische B-Vorläuferzellen nachgewiesen werden. Die Interaktion beider Moleküle (CD40-CD40L) führt zu einer Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen, verstärkt deren Antigenpräsentation und hemmt deren Zelltod. Andererseits kann sie auch die Expression des Apo-1/Fas-Antigens erhöhen, das die Apoptose vermittelt. Unsere Untersuchungen ergaben, dass BVZ-ALL-Zellen jedoch vorwiegend keine Expression des kostimulatorischen Moleküle B7.1 (CD80) haben. Ebenfalls war eine Expression von ICAM-1 größtenteils nicht nachweisbar, CD58 wurde jedoch konstitutiv exprimiert. Beide Rezeptoren wurden mit der Vermittlung einer zytolytischen Toxizität gegen Leukämiezellen in Verbindung gebracht. Ein Einfluss verschiedener Zytokine auf die Expression kostimulatorischen Molekülen ist wahrscheinlich, da IL-10 an der Entwicklung einer tumorassoziierten Anergie beteiligt sein kann. IL-10 unterdrückt die Expression von Adhäsions- (ICAM-1) sowie von kostimulatorischen Molekülen (B7.1, B7.2) und des Mac-Komplexes.^{307,308}

3.5.4 Zytokin/Zytokinrezeptor *splice*-Varianten

Zusätzlich zur Interaktion antagonistisch oder synergistisch agierender Zytokine wird durch alternatives prä-mRNA-*splicing* eine weitere Möglichkeit zur Modulation von Zytokineffekten bereitgestellt. Der *splicing*-Mechanismus ermöglicht eine *posttranskriptionelle* Kontrolle der Genexpression und erweitert dadurch die Variationsbreite der Expression vom Zytokin und korrespondierendem Rezeptor.³⁰⁹ In der Z/ZR-Familie ist alternatives *splicing* ein häufig beobachtetes Prinzip zur Generierung verschiedener Proteinisoformen ausgehend von einem einzigen Genlocus.^{310,311} Die Expression von Zytokin- und Zytokinrezeptor-*splice*-Varianten wird dabei in Abhängigkeit vom Zelltyp, von der Zelldifferenzierung³¹² und -Aktivierung unterschiedlich reguliert.³¹³⁻³¹⁶ Die Modulation der Genexpression durch *posttranskriptionelle* Mechanismen, wie z.B. die Prozessierung der precursor-mRNA im Kern, den nukleocytoplasmatischen Transport und die mRNA-Stabilität, sind wichtige Kontrollpunkte während des Wachstums und der Differenzierung von Zellen.

3.5.4.1 Zytokinvarianten

Sowohl von *IL-2*, *IL-4* als auch *IL-7* sind Transkriptvarianten bekannt. In den *splice*-Varianten von *IL-2*, *IL-2 δ 2* und *IL-2 δ 3*, fehlt das Exon 2 bzw. 3,³¹⁷ bei *IL-4 δ 2* das Exon 2³¹¹ und bei *IL-7 δ 4* das Exon 4.³¹⁸ Diese durch alternatives prä-mRNA-*splicing* generierten Proteinisoformen von Zytokinen können als kompetitive Inhibitoren der normalen Isoformen mit höherer Rezeptorbindungsaktivität wirken. In den obengenannten Zytokinvarianten sind die verbleibenden Exons ohne Leseraster-Verschiebung, *in frame* miteinander verbunden.^{319,320} Die Fähigkeit des *IL-4 δ 2*, die Funktion des kompletten *IL-4* zu hemmen, bzw. die Balance zwischen *IL-4* und *IL-4 δ 2* könnte für die Regulation von *IL-4*-Effekten wichtig sein. *RhIL-4 δ 2* inhibiert die *IL-4*-stimulierte T-Zellproliferation und konnte in geringer Konzentration in PBMC, in hoher Konzentration in Thymozyten sowie in Zellen der Atemwege nachgewiesen werden.³²⁰ Mutierte *IL-4*-Isoformen können die Apoptose von Leukämiezellen induzieren.³²¹ Die Zytokinisoformen von *IL-2*, *IL-2 δ 2* und *IL-2 δ 3*, wirken analog zu *IL-4 δ 2* als kompetitive Inhibitoren der *IL-2*-stimulierten T-Zellproliferation.³¹⁷

IL-7-splice-Varianten

Wie in der Arbeit von Korte et al.²⁹⁷ beschrieben, konnten wir zeigen, dass von dem Liganden des *IL-7*-Rezeptors, *IL-7*, verschiedene *splice*-Varianten in Leukämiezellen nachzuweisen

sind. Die biologische Wirkung dieser unterschiedlichen *in frame* oder *out of frame* Varianten auf die Regulierung der IL-7-Transkription und auf die IL-7 Funktion ist weitestgehend noch nicht analysiert wurden. Die Funktionsanalyse erschwerend ist, wie bereits erwähnt, die Abhängigkeit zytokininduzierter Effekte vom Differenzierungs- und Aktivierungsgrad der Zellen. Die vermeintliche Funktion der IL-7-Proteinisoformen lässt sich jedoch möglicherweise durch die vergleichende Analyse der mRNA-Sequenzen, der drei-dimensionalen Molekularstruktur des IL-7 Proteins und durch detailliertere Kenntnisse über die Interaktion mit den entsprechenden Rezeptorketten ableiten. Wegen des Fehlens bestimmter Aminosäuren und damit von potentiellen Bindungsstellen ist bei den *in frame* Varianten anzunehmen, dass die Bindung an der IL-7-spezifischen α -Rezeptorkette und der γ_c -Untereinheit verändert ist. Dies hat Auswirkungen sowohl auf die Rezeptoraffinität als auch auf die Signalübertragung durch den heterodimeren IL-7-Rezeptorkomplex.

Obwohl die physiologische Bedeutung der von uns entdeckten *IL-7-splice*-Varianten und des bekannten *IL-7 δ* nicht bekannt ist, sind funktionellen Überlegungen möglich. Aufgrund des Klassifizierungssystem basierend auf der helikalen Struktur von Zytokinen und den molekularen Ähnlichkeiten der jeweiligen Rezeptoren gehören IL-2, IL-4 und IL-7 zu derselben Zytokinsuperfamilie, der hämatopoetischen Zytokinrezeptorfamilie, und weisen eine signifikante Redundanz ihrer biologischen Aktivität auf. Es ist anzunehmen, dass die durch alternatives *splicing* hergestellten IL-7-Proteinisoformen eine vergleichbare biologische Funktion aufweisen. Diese IL-7-Isoformen könnten, auf ähnliche Weise wirkend wie die oben genannten Isoformen, möglicherweise bedeutsam für die Modulation IL-7-vermittelter biologischer Effekte sein. Als potentieller Inhibitor IL-7-vermittelter stimulatorischer Effekte auf antitumorreaktive mononukleäre Zellen könnten die IL-7-Isoformen oder ein verändertes Verhältnis zwischen normalen IL-7 und IL-7-Isoformen als ein wichtiger Faktor betrachtet werden, der zum Versagen der immunologischen Antitumorantwort und folglich zur Entstehung von lymphoproliferativen Erkrankungen beiträgt. Andererseits könnten diese Isoformen therapeutisch zur Hemmung von IL-7-vermitteltem Zellwachstum oder anderer durch Stimulation des IL-7-Rezeptors bewirkter Effekte nützlich sein.

3.5.4.2 Zytokinrezeptoren

Lösliche Zytokinrezeptoren können entweder durch proteolytische Spaltung (TNFR, IL-1R, IL-2R, M-CSF-R, PDGFR) eines exprimierten membrangebundenen Rezeptors oder durch

alternatives mRNA-*splicing* (IL-2R α , mIL-4R α , IL-7R α ,³²² IL-9R α , IL-17R,³²³ EPO-R, GM-CSFR,³²⁴ G-CSFR) gebildet werden. Durch den *splicing*-Prozess kommt es zum selektiven Ausschluss oder zusätzlichen Gebrauch eines Exons, welches zu einer Verschiebung des Leserasters und zur Termination der Transkription vor der Transmembranregion führt, die zur Integration des Rezeptors in der Zellmembran nötig ist. Ist das Stoppkodon hinter der Transmembranregion gelegen, bleibt der Rezeptor membrangebunden, erhält aber eine verkürzte zytoplasmatische Domäne (*growth hormone receptor* (GHR)).³²⁵ Zusätzliche Exons enthalten häufig ein Stoppkodon. Befindet sich dieses vor der Transmembranregion, resultiert wieder ein lösliches Protein (IL-5R,³²⁶ mIL-4R³²⁷). Beim Erythropoietinrezeptor (EpoR) ist eine membrangebundene Variante mit stark verkürzter zytoplasmatischer Domäne bekannt.³¹⁴ Hier liegt das zusätzliche Exon *downstream* des für die Transmembranregion kodierenden Bereiches.

3.5.4.3 IL-7R- und IL-4R-Varianten

Neben dem Transkript vollständiger Länge konnten wir drei weitere *splice*-Varianten des IL-7R-Transkripts (Korte et al.)²⁹⁷ mit verkürzter zytoplasmatischer Region oder deletierter transmembranöser und zytoplasmatischer Domäne identifizieren. Allen Isoformen ist die erhaltene extrazelluläre, ligandenbindende Domäne gemein. Die Signaltransduktion ist jedoch bei den verkürzten membranständigen Isoformen wegen des Fehlens großer Anteile der zytoplasmatischen Region einschließlich der dort lokalisierten essentiellen signaltransduktori-schen Domänen (s. Abbildung 14 und Abbildung 15) entscheidend gestört.³²⁸ Eine Variante, der lösliche IL-7R α , entsteht durch *exon-skipping* von Exon 6 und dem damit verbundenen Verlust der transmembranen und zytoplasmatischen Domänen. Die physiologische Bedeutung dieses für IL-7 hochaffinen, löslichen Rezeptors, der sowohl als Inhibitor als auch als *carrier* seines Liganden fungieren könnte, ist noch unbekannt. IL-7-Rezeptoren werden auf B- und T-Vorläuferzellen, reifen T-, LAK-Zellen sowie Makrophagen/ Monozyten, jedoch nicht auf reifen B-Zellen exprimiert,^{329,330} in Übereinstimmung mit dem fehlenden Effekt von IL-7 auf reife B-Zellen. Bei den meisten in unserer Studie analysierten ALL wurden neben dem normalen IL-7R α auch dessen *splice*-Variante nachgewiesen.

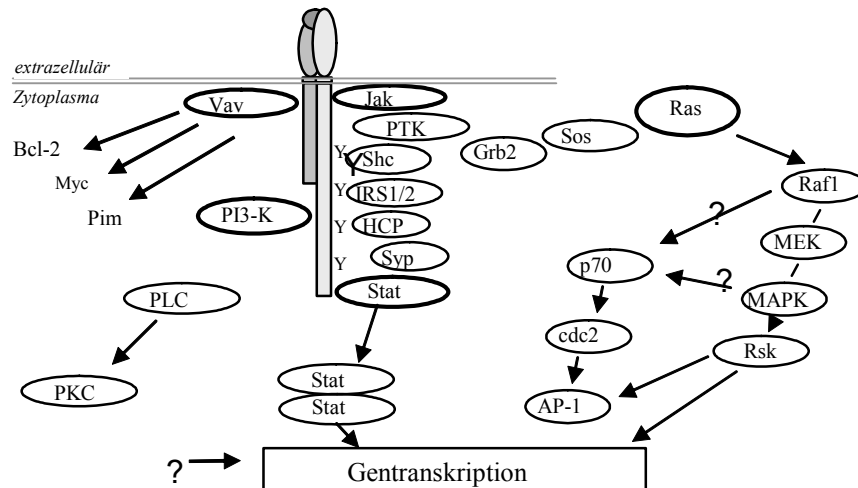


Abbildung 14: Signaltransduktion über einen heteromeren Zytokinrezeptorkomplex (hell-, mittelgrau) nach Ligandenbindung (dunkelgrau). Schematische Darstellung der Jak-Bindung, Autophosphorylierungsstellung (Y) und der verschiedenen Signaltransduktionswege einschl. Stat-Dimerisierung.

Alle *IL-7R*-Varianten entstehen, wie die von uns ebenfalls identifizierte und funktionell charakterisierte *IL-4R*-Proteinisoform, *IL-4R α_{IT}* (*intracytoplasmic truncated*, IT), durch alternatives *splicing* mit resultierender Verschiebung des Leserasters und der Entstehung eines Stoppkodons. In der *IL-4R α_{IT}* -Isoform bleibt nur die membranproximale *homology box 1* erhalten. Alle Tyrosinreste und die für die Proliferation essentielle glutaminreiche Region in *IL-4R α_{IT}* fehlen. Entsprechend zeigten stabil-transfizierte, murine *IL-4R α_{IT}* -exprimierende Ba/F3 Zellen (*IL-3* wachstumsfaktorabhängige pro-B-Zelllinie) nach Stimulation mit h*IL-4* (nach *IL-3* Entzug) eine fehlende Proliferation und ein Übergang der Zellen in die Apoptose. Die biologische Wirkung der beiden *IL-7R*-Isoformen wird gegenwärtig analysiert. Diese könnten ähnlich divergente biologische Funktion aufweisen, wie für die intrazellulär verkürzten Isoformen des Erythropoietinrezeptors beschrieben worden, welche keine Proliferation zu vermitteln und die Funktion des Rezeptors vollständiger Länge zu inhibieren vermögen.

Die bekannten Informationen über die strukturelle Organisation der zytoplasmatischen Domäne berücksichtigend kann die folgende, aus dem Verlust wichtiger intrazellulärer Regionen resultierende Konsequenz abgeleitet werden. Bei erhaltener Funktion membranproximaler Sequenzen würde in beiden Isoformen der Verlust der membrandistalen Domäne das Gleichgewicht zwischen proliferations- und differenzierungsinduzierenden Signalen entscheidend

verändern. Die resultierende Prädominanz von mitogenen IL-7-Effekten könnte für die leukämiespezifische Expansion und folglich für die Leukämogenese bedeutsam sein.

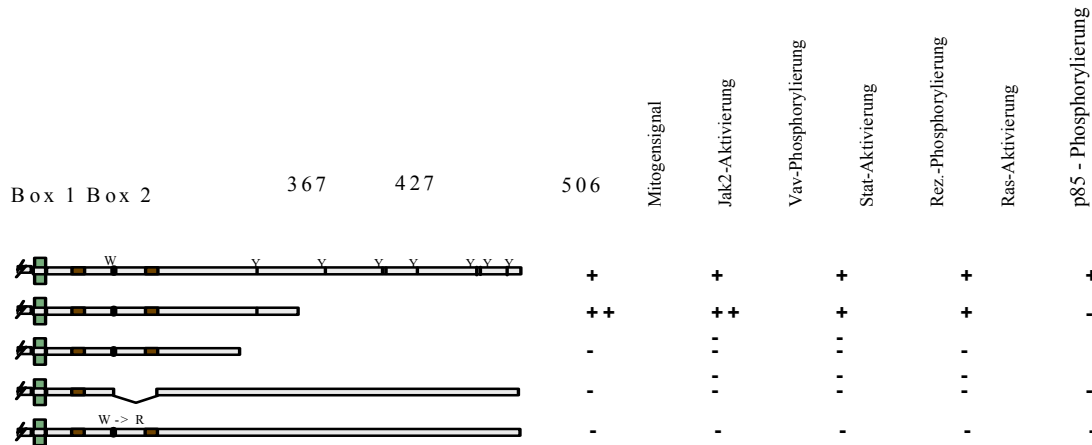


Abbildung 15: Schematische Darstellung funktioneller zytoplasmatischer Domänen von Zytokinrezeptoren am Beispiel des Erythropoietinrezeptors.

Auch für andere Mitglieder derselben Rezeptorfamilie sind lösliche Rezeptoren beschrieben wurden, die durch alternatives *splicing* oder durch proteolytische Spaltung eines exprimierten membranständigen Rezeptors entstanden sind. In diesem Zusammenhang ist zu bemerken, dass einzelne lösliche Rezeptorisoformen mit einigen malignen Erkrankungen assoziiert sind und als Tumormarker sowohl in pädiatrischen als auch adulten Leukämien dienen. Die physiologische Rolle der IL-7-Rezeptorisoformen in der Signalübertragung und ihre potentielle Signifikanz in tumorassoziierten pathologischen Zuständen sind jedoch derzeit nicht bekannt. Für die lösliche Isoform kommt eine Funktion entweder als Inhibitor oder als *carrier* ihres Liganden in Betracht. Durch kompetitive Ligandenbindung könnte eine Beeinträchtigung der IL-7-vermittelten Generierung von tumorlytischen Zellen und eine Hemmung einer effizienten immunologischen Antitumorantwort herbeigeführt werden. Im Gegensatz ist auch eine, den proliferativen Effekt von IL-7 auf die Leukämiezelle verstärkende, synergistische Funktion denkbar. Zuletzt könnte auch die Assoziation der löslichen Isoform mit normalerweise nicht-bindenden Rezeptoruntereinheiten die autokrine Stimulation des Wachstums von malignen Zellen erhöhen.

3.5.5 Zusammenfassung: Zytokin/Zytokinrezeptoren bei ALL

Zytokine und Zytokinrezeptoren sind nicht nur essentiell für das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung von normalen hämatopoetischen und lymphatischen Zellen sondern auch von Leukämiezellen und für die antileukämische Immunantwort. Ihre apoptosemodulierenden Eigenschaften können zudem die Wirksamkeit der antineoplastischen Therapie beeinflussen. Dabei spielen autokrine/parakrine Mechanismen und gegenseitige Interaktionen zwischen Leukämiezellen und Stromazellen im Knochenmarkmilieu entscheidende Rollen.

Leukämiezellen exprimieren zu beiden ALL-Erkrankungszeitpunkten im Kindesalter eine Vielzahl von Zytokinen und deren Rezeptoren. Somit scheinen Lymphoblasten für viele Wachstumsfaktoren sensitiv zu sein, die mitunter von der Leukämiezelle selbst produziert werden. Diese biologisch aktiven Wachstumsfaktoren sind potentiell an der autokrinen/parakrinen Regulation der Leukämogenese, der Kontrolle der Immunmodulation, der Verhinderung des apoptotischen Tumorzelltodes, der Zellproliferation und der Angiogenese/Neovaskularisierung beteiligt.

Bekanntlich werden zur Erzeugung einer spezifischen T-Zellantwort die Interaktion mit antigenpräsentierenden Zellen (APC) durch die entsprechenden Adhäsions-, kostimulatorischen und Peptid/MHC-TZR-Moleküle und die daraus resultierende Sekretion von primären und sekundären Zytokinen benötigt. Störungen einer dieser Interaktionen können zu einer Anergie oder Toleranzentwicklung der T-Lymphozyten führen. Die Sekretion von Zytokinen durch Leukämiezellen und die Abwesenheit oder Herunterregulation von Adhäsions- (ICAM-1) und Kostimulationsmolekülen (B7.1) repräsentieren möglicherweise effektive Mechanismen zur Umgehung der Immunerkennung von Leukämiezellen bei ALL-Rezidiven.

Die potentielle Bedeutung einer inadäquaten Aktivität zytokinrezeptorexprimierender Zellen oder eines pathologisch veränderten Zytokinexpressionsmusters, dessen Folgen einerseits in einer autokrinen oder, indirekt, einer parakrinen Wachstumsstimulation leukämischer Zellen und andererseits in einer Immunregulationsstörung und dadurch bedingtem Ausbleiben einer effizienten Tumorzellabwehr gesehen werden können, steht seine therapeutische Verwendbarkeit im Rahmen immunmodulatorischer Behandlungskonzepte gegenüber. Am aussichtsreichsten erscheint dabei die Weiterentwicklung verschiedener Transfektions-/ Vakzinationsstrategien, welche die Auslösung einer wirksamen Immunreaktion durch T-Zellaktivierung anstreben. In diesem Zusammenhang ist die individuelle Analyse der Z/ZR-Expression von Leukämie- und Stromazellen essentiell, um zugrunde liegende Regelkreise zu

identifizieren, die für Überleben und Proliferation von Leukämiezellen unentbehrlich sind sowie deren Entgehen vor der Immunkontrolle ermöglichen.

Die Fähigkeit der Zytokinisoformen, die Funktion des normalen Zytokins zu hemmen, bzw. das Gleichgewicht zwischen beiden könnte für die Regulation der Zytokineffekte wichtig sein. Als Inhibitoren der stimulatorischen Wirkung der genannten Zytokine auf antitumorreaktive, mononukleäre Zellen kämen die alternativen Zytokin-*splice*-Varianten bzw. deren Proteinprodukte möglicherweise als zentrale Faktoren für das Versagen der immunologischen Tumorzellabwehr in Frage und könnten dadurch indirekt die Entwicklung einer Leukämie begünstigen.

3.5.5.1 Publikationen zum Projekt 5

1. Korte A, Kochling J, Badiali L, Eckert C, Andreae J, Geilen W, Kebelmann-Betzing C, Taube T, Wu S, Henze G, **Seeger K**: Expression analysis and characterization of alternatively spliced transcripts of human IL-7Ralpha chain encoding two truncated receptor proteins in relapsed childhood ALL. *Cytokine* 12:1597-608 (2001)
2. Kebelmann-Betzing C, Körner G, Badiali L, Buchwald D, Möricke A, Korte A, Kochling J, Wu S, Kappelmeier D, Oettel K, Henze G, **Seeger K**: Characterization of cytokine, growth factor receptor, costimulatory and adhesion molecule expression patterns of bone marrow blasts in relapsed childhood B cell precursor ALL. *Cytokine* 13:39-50 (2001)
3. Korte A, Möricke A, Beyermann B, Kochling J, Taube T, Kebelmann C, Henze G, **Seeger K**: Extensive alternative splicing of interleukin-7 in malignant hematopoietic cells: implication of distinct isoforms in modulating IL-7 activity. *J Interferon Cytokine Res* 19:495-503 (1999)
4. Wellmann S, Taube T, Paal K, v. Einsiedel H, Geilen W, Seifert G, Eckert C, Henze G, **Seeger K**: Specific reverse transcription-PCR quantification of vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants by LightCycler technology. *Clin Chem* 47:654-60 (2001)

3.6 PROJEKT 6: HEREDITÄRE POLYMORPHISMEN VON ZYTOSTATIKA-METABOLISIERENDEN ENZYSYSTEMEN BEI KINDERN MIT ALL-REZIDIV

Obwohl die ALL die häufigste neoplastische Erkrankung im Kindesalter ist, sind die Faktoren, die ursächlich an der Leukämogenese und an der Resistenzentwicklung beteiligt sind, weitestgehend unbekannt. Zu den molekularen Mechanismen der Chemotherapieresistenz zählen pharmakogenetische/-kinetische Merkmale, Proteininduktionen sowie individuelle zelluläre und Gewebeeigenschaften. Fremdstoff-metabolisierende Enzymsysteme stellen einen der ersten Resistenzmechanismen gegenüber Umweltgiften und Chemikalien, einschließlich Medikamenten, dar. Viele dieser Enzyme wirken sequentiell zur Ausscheidung von toxischen Substanzen. Medikament oder Karzinogen können somit erst in toxischere Metabolite durch Zytochrom P450 (Phase I Metabolismus) aktiviert und danach zur Erhöhung deren Löslichkeit und zur Beschleunigung der Ausscheidung durch Glutathion-S-Transferasen (GST) oder N-Acetyltransferasen (NAT; Phase II Metabolismus) konjugiert werden.

3.6.1 Hereditäre Polymorphismen und Malignomrisiko

Einige Studien haben einen Zusammenhang zwischen hereditären Polymorphismen der Fremdstoff-metabolisierenden Enzyme Zytochrom P4501A1 (CYP1A1), Glutathion-S-Transferase (GST) (μ , τ , π , α),³³¹ Thiopurin-Methyltransferase (TPMT) oder/und N-Acetyltransferase-2 (NAT2) und dem Risiko der Entstehung einer Neoplasie gefunden. Diese umfassen Untersuchungen zu Neoplasien der Lunge, Harnblase, HNO, Cervix, Mamma und des Magen-Darm-Traktes.³³²⁻³³⁸ Ebenfalls werden erhöhte Schwesternchromosomenaustauschraten bei bestimmten Allelvarianten (GSTT) festgestellt.^{339,340} Die Assoziation zwischen genetischen Variationen und einem erhöhten Malignomrisiko lässt jedoch auch für die Leukämie im Kindesalter die Annahme zu, dass neben Umwelteinflüssen (Infektionen, Karzinogene) hereditäre Faktoren die Leukämogenese und darüber hinaus die Therapie und Prognose beeinflussen.

In einem umfangreichen Projekt haben wir die Frequenz der genetischen Polymorphismen von Medikamenten-metabolisierenden Enzymsystemen der Phase I und II bei ALL-Rezidiven im Kindesalter sowie deren Einfluss auf Therapie, Rezidivhäufigkeit und Langzeitüberleben (pEFS, pSurvival) als auch deren Assoziation an einer ALL zu erkranken, analysiert. Die Patienten wurden entsprechend den multizentrischen Studien ALL-REZ BFM behandelt. Retro-

spektiv und prospektiv wurden die Polymorphismen von Zytochrom P450-Enzymen (*CYP1A1*, *CYP3A4*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP1B1*) und Enzymsystemen der Phase 2 (*GSTM1*, *GSTM1*A/B*, *GSTT1*, *GSTP1*, *TPMT*, *NAT2*) bei Kindern mit ALL-Rezidiv bzw. –Ersterkrankung und einer gesunden Kontrollgruppe analysiert. An dieser Stelle werden die Daten zusammengefasst, die auf internationalen Kongressen präsentiert und diskutiert wurden.

3.6.1.1 Glutathion-S-Transferasen GST

Die Konjugation von hydrophoben und elektrophilen Substanzen mit Glutathion, die durch Glutathion-S-Transferasen (GST) katalysiert wird, ist einer der wichtigsten Metabolisierungswege von mutagenen und karzinogenen Substanzen, u.a. von Organophosphaten (einschließlich Pestizide), alkylierende Substanzen (z.B. Zytostatika), Epoxiden, Arylaminen und polyzyklischen aromatischen Verbindungen.^{341,342} Veränderung der DNA verursacht vorwiegend eine Störung der DNA-Replikation und -Transkription in sich schnell-teilenden, proliferierenden Zellen. Andererseits können jedoch infolge der Glutathionkonjugation durch das GSTT1-Enzym toxische Metabolite gebildet werden (z.B. Dichlormethan, Dichlorethan).^{343,344}

Beim Menschen sind die *GSTM1*- und *GSTT1*-Genotypen polymorph und das Fehlen jeglicher Enzymaktivität beruht auf hereditäre homozygoten Deletionen der Gene (Nullgenotyp).^{341,345} Der *GSTM1* (*GSTT1*) -Wildtypallel wird als *GSTM1*1* (*GSTT1*1*) bezeichnet, die *GSTM1*-Deletion als *GSTM1*0* (*GSTT1*0*). Bei *GSTP1* führt eine Punktmutation zur Inaktivierung des Enzyms. Bisherige Studien, die die Beziehung zwischen GST-Genotyp, Ätiologie und Therapieerfolg bei Kindern mit ALL-Ersterkrankung untersuchten, haben widersprüchliche Ergebnisse ergeben.³⁴⁶⁻³⁴⁹

3.6.1.1.1 GSTT1-Genotyp bei ALL-Rezidiv

In unseren Analysen von Kindern mit ALL-Rezidiv (n = 210) konnten signifikante Unterschiede zwischen *GSTT1*-Null- (*GSTT1*0/*0*) und non-Nullgenotyp bei den Häufigkeitsverteilungen der Geschlechter, beim Ansprechen auf die Rezidivtherapie und in der pEFS/pSurvival ermittelt werden. Mädchen hatten eine signifikant niedrigere *GSTT1*-Nullgenotyp-Inzidenz als Jungen (13 vs. 25 %; p = 0.04). Eine Remission erreichten 90 % der Patienten mit *GSTT1*0/*0* (37/41) im Gegensatz zu nur 75 % mit einem non-Nullgenotyp (p

= 0.05). Kinder mit BVZ-ALL-Erstrezidiv und *GSTT1**0/*0-Genotyp hatten ein besseres pEFS und Survival ($p = 0.04$ und $p = 0.01$) (s. Abbildung 16).

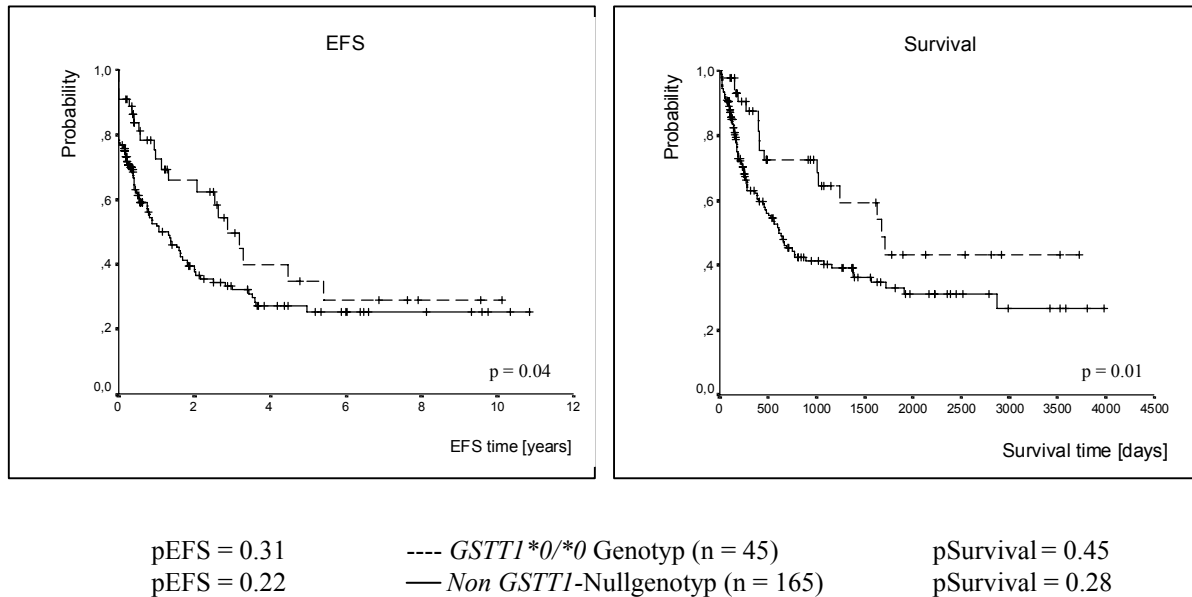


Abbildung 16: Kaplan Meier Kurve der pEFS/pSurvival von 210 Kindern mit BVZ-ALL-Erstrezidiv nach *GSTT1*-Genotyp (ALL-REZ BFM).

3.6.1.1.2 *GSTP1*-Genotyp bei ALL-Rezidiv

Elf Prozent der Kinder mit BVZ-ALL-Erstrezidiv ($n = 116$) waren homozygot *GSTP1**B, wobei deutliche Häufigkeitsdifferenzen zwischen Geschlechtern existieren (3 % bei Mädchen, 15 % bei Jungen; Allelfrequenz 26 % vs. 37 %). Die Patienten mit *GSTP1**B/*B Genotyp zeichneten sich, wie die mit *GSTT1*-Nullgenotyp, durch ein exzellentes Ansprechen auf die Rezidivchemotherapie aus (s. Abbildung 17). Bei Patienten, die nicht homozygot *GSTP1**B/*B waren (*GSTP1**A/*A oder *GSTP1**A/*B) war die Remissionsrate jeweils nur ca. 80 %. Die Kaplan-Meier Kurve des pEFS von *GSTP1**B/*B vs. *non*-*B/*B ist in Abbildung 17 dargestellt. Der pEFS-Unterschied zwischen beiden Gruppen ist grenzgradig signifikant ($p = 0.07$).

Obwohl der *GSTP1**B/*B-Genotyp häufiger bei *TEL-AML1* und *BCR-ABL* positiven BVZ-ALL-Erstrezidiven im Vergleich zur Gesamtzahl vertreten war *GSTP1**B/*B (25 % und 29 %), war der Unterschied wegen der geringen Patientenzahl nicht signifikant.

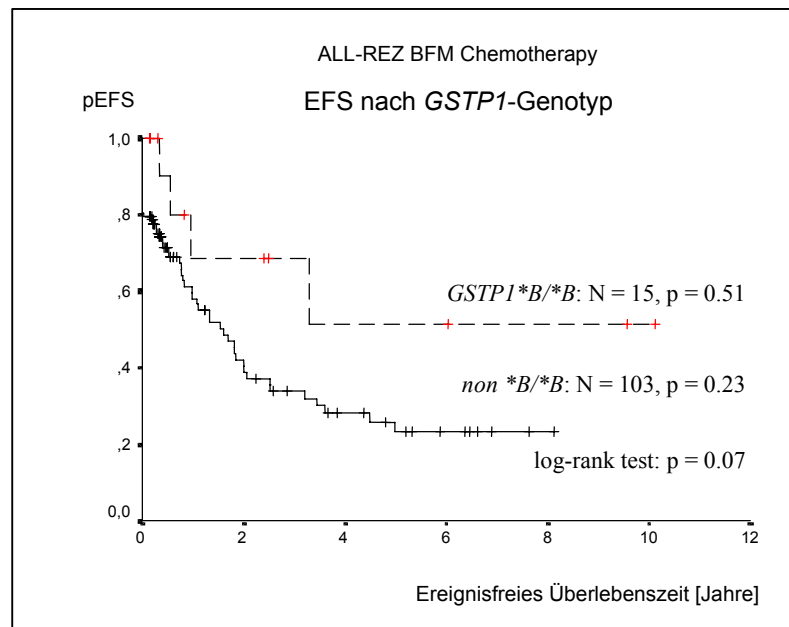


Abbildung 17: Kaplan Meier Kurve des ereignisfreien Überlebens (EFS) von 116 Kindern mit BVZ-ALL-Erstrezidiv nach *GSTP1*-Genotyp (ALL-REZ BFM).

3.6.1.2 *CYP1A1*-Genotyp

Bisher sind mehr als 37 Zytochrom P450 Familien mit mehr als 480 P450-Genen in Eukaryoten und Prokaryoten gefunden wurden. Das Zytochrom P4501A1 (*CYP1A1*), ein Phase I Enzym, ist in den Metabolismus aromatischer Xenobiotika involviert. Das *CYP1A1*-Genprodukt, die aromatische Hydrocarbon-Hydroxylase (AHH), katalysiert den ersten Schritt im Stoffwechsel von polyzyklischen aromatischen Verbindungen. Es wird in verschiedenen Geweben, u.a. auch in Lymphozyten, exprimiert. Die teilweise hochreaktiven Metaboliten stehen im Verdacht, die Entstehung von Tumoren zu fördern oder unspezifische Zellschäden zu verursachen.

Die Transition A4889G (Isoleucin/Valin-Austausch) konnte als Suszeptibilitätsfaktor maligner Erkrankungen nachgewiesen werden.^{350,351} Diese im katalytisch aktiven Zentrum von *CYP1A1* befindliche Mutation führt zu einer höheren Aktivität in Lymphozyten. Eine T→C

Transition (MspI-Polymorphismus, m1; *CYP1A1**2A) in der 3'-flankierenden Region korrelierte in einer japanischen Studie mit einem höheren Lungenkarzinomrisiko,³⁵² was von anderen jedoch nicht bestätigt werden konnte.^{353,354} Diese Beobachtungen können mit endemischen Unterschieden zusammenhängen. Ein weiterer MspI-Polymorphismus (m3), der ausschließlich bei Schwarz-Afrikanern auftritt, wurde von Crofts et al.³⁵⁵ beschrieben. Die T → C Transition ist in der 3'-UTR proximal der ersten MspI-Schnittstelle lokalisiert. Der Polymorphismus m3 wird kontrovers als Suszeptibilitätsfaktor diskutiert.³⁵⁶⁻³⁵⁸ Eine vierte C4887A-Mutation, die zu einem Austausch von Asparagin gegen Threonin führt, wurde kürzlich von Cascorbi et al.³⁵⁹ entdeckt. Eine erhöhte Aktivität und *CYP1A1*-Induktion wurde für die Varianten *CYP1A1**2A-*3 nachgewiesen.^{355,359-361} Die Frequenz von *CYP1A1*-Mutationen bei 880 unverwandten Kaukasiern war für m1 7.7 %, m2 2.7 % und m4 3 %.³⁵⁹

3.6.1.2.1 *CYP1A1* bei ALL-Rezidiven

Die Responderaten der Patienten mit erstem BVZ-ALL-Rezidiv, die eine *CYP1A1*-Wildtypkonstellation, und denen, die eine Allelmutante (*CYP1A1*-Variante) aufwiesen, sind signifikant unterschiedlich (83 % vs. 71 %; $p = 0.03$) (s. Abbildung 18). Sowohl im pEFS (pEFS = 0.28 vs. 0.07; $p = 0.0068$) als auch im Überleben (pSurvival = 0.31 vs. 0.06; $p = 0.0003$) sind diese signifikant unterschiedlich (s. Abbildung 18). Diese Analysen bleiben auch signifikant, wenn *BCR-ABL* positive Leukämien ausgeschlossen werden bzw. wenn die Analyse unter Einschluss von T-Zell-Leukämien durchgeführt wird. Die *BCR-ABL* negativen Patienten ($n = 98$) mit *CYP1A1*-Wildtypgenotyp hatten ein Anprechen auf die Therapie von 85 % (vs. 80 %) und eine pEFS von 0.35 (vs. 0.08; $p = 0.01$). Bei Einschluss aller ALL-Immunphänotypen ($n = 171$) war die Response 77 % ($n = 36$) gegenüber 75 % ($n = 135$) und die pEFS = 0.25 gegenüber 0.07 ($p = 0.03$). Patienten mit einer *CYP1A1*-Allelmutante hatten höhere Induktionstodesfälle als die mit *CYP1A1*-Wildtypsequenz (16 % vs. 4 %).

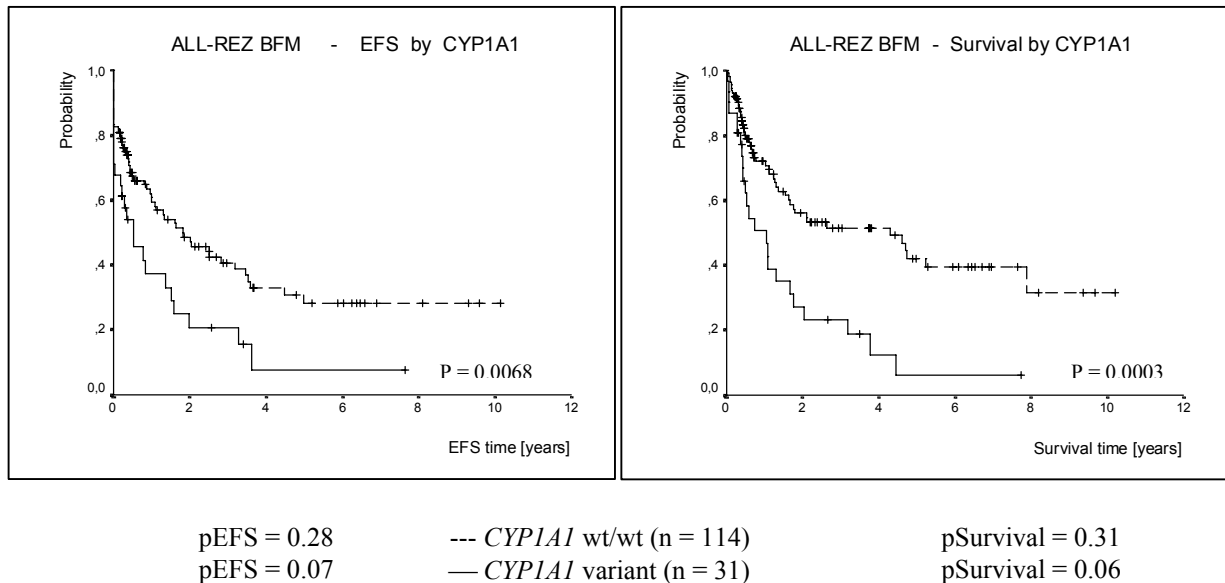


Abbildung 18: Kaplan Meier Kurve der pEFS und der pSurvival von 145 Kindern mit BVZ-ALL-Erstrezidiv nach *CYP1A1*-Genotyp (ALL-REZ BFM).

3.6.1.2.2 Synergistische Wirkung von *CYP1A1*/*GSTP1*-Genotyp bei ALL-Rezidiv

Die synergistische Wirkung von genetischen Polymorphismen auf die Effektivität, die Toxizität und den Therapieerfolg von Kindern mit erstem BVZ-ALL-Rezidiv, die entsprechend der multizentrischen Rezidivstudien ALL-REZ BFM behandelt worden, wird deutlich, wenn die Allelkonstellationen von *CYP1A1* and *GSTP1* zusammen betrachtet werden. Kinder mit *CYP1A1*-wt/*GSTP1**B Genotyp hatten eine signifikant bessere pEFS als diejenigen mit *CYP1A1*-wt/*GSTP1**A oder *CYP1A1*-v/*GSTP1**A Genotyp [pEFS = 0.60 vs. 0.28 vs. 0.11; p = 0.019] (s. Abbildung 19). Diese Daten zeigen, dass die DNA-Genotypisierung zur Individualisierung der Therapie von Kindern mit ALL-Rezidiv beitragen können. Bei prätherapeutischer Kenntnis der Genotypen wäre die Auswahl von geeigneteren Medikamenten und die Modifizierung der Medikamentendosierung möglich, um entsprechend effektivere und weniger toxische chemotherapeutische Protokolle zu entwerfen.

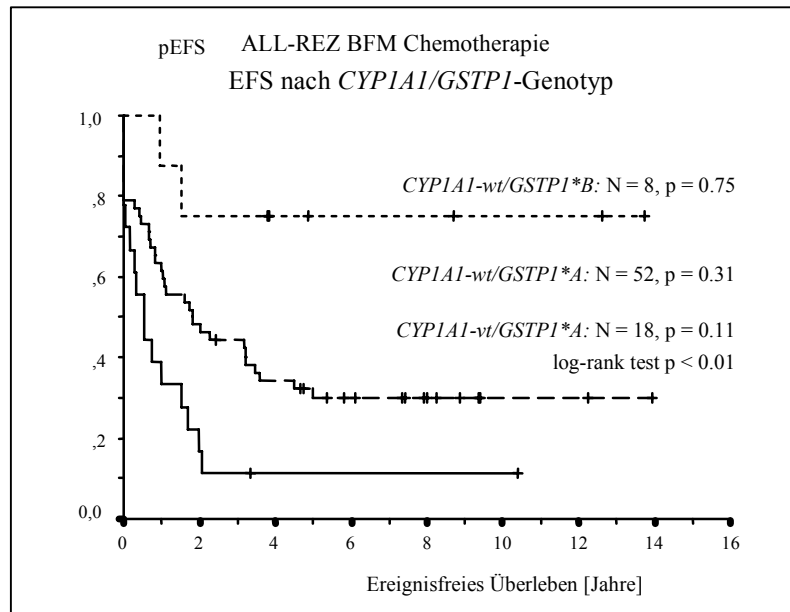


Abbildung 19: Kaplan Meier Kurve des pEFS von 78 Kindern mit BVZ-ALL-Erstrezidiv nach *CYP1A1/GSTP1*-Genotyp (ALL-REZ BFM).

3.6.2 Zusammenfassende Diskussion: Hereditäre Polymorphismen und ALL-Rezidiv

GST-Polymorphismen und ALL

Die Studien, die die Assoziation zwischen *GST*-Genotyp, Ätiologie und Heilungschancen von Kindern mit ALL-Ersterkrankungen untersuchten, haben teilweise sehr widersprüchliche Ergebnisse ergeben.^{346,348,362,363} Während das ALL-Risiko im Kindesalter bei kanadischen Kindern mit bestimmten Genotypen von *CYP1A1* und *GSTM1*,³⁶³ bei Afro-Amerikanern mit *GSTM1* und *GSTT1*,³⁶⁴ sowie ein erhöhtes myelodysplastisches Syndrom (MDS)-Risiko mit *GSTT1*³⁶² in Verbindung gebracht wurde, konnte dies in einer neuen Veröffentlichung der amerikanischen *Children's Cancer Group* (CCG) an einer großen Patientenzahl nicht bestätigt werden.³⁴⁸ Ebenso findet die CCG-Gruppe, im Gegensatz zur BFM-Fallkontrollstudie von Stanulla et al.,³⁴⁶ keine Assoziation zwischen *GSTM1/GSTT1*-Genotyp und dem Therapieerfolg. Strenge match-Kriterien in der letztgenannten Analyse ergaben ein signifikant niedrigeres Rezidivrisiko in Verbindung mit dem *GSTM1*- und *GSTT1*-Nullgenotyp. Die match-Strategie bedingte jedoch den Einschluss nur einer beschränkten Patientenzahl in die Studie und führte dadurch ebenfalls zur Selektion eines bestimmten Subtyps in die Analyse (BVZ-ALL, Standard/Intermediärrisiko). Die Ergebnisse können deshalb wahrscheinlich nicht auf

die ALL-Gesamtpopulation verallgemeinern. Möglich ist auch, dass der Einfluss des *GST*-Genotyps in den verschiedenen Therapieprotokollen unterschiedlich ist. Ebenfalls lässt sich nicht ausschließen, ob diese differenten Ergebnisse auf populationsbedingte Unterschiede beruhen. Folglich könnte der *GST*-Genotyp die genetische Suszeptibilität, eine Leukämie zu entwickeln, oder die Auswirkung äußerer Einflüsse, die zur Leukämogenese beitragen, beeinflussen. Die Analyse der CCG-Gruppe an einer großen Patientenzahl lässt jedoch keinen größeren Effekt der *GST*-Genotypen auf die Suszeptibilität und auf den Therapieerfolg als wahrscheinlich erscheinen. Nichtsdestotrotz können die berichteten unterschiedlichen Therapieergebnisse von Kindern mit ALL-Ersterkrankung bezüglich des Rezidivrisiko und des Überleben auf die Verwendung von unterschiedlichen Therapieprotokollen zurückzuführen sein.

Die Interaktion zwischen Medikamenten und GST-Enzymen ist vielfältig. Gewöhnlich hängt die Resistenz gegenüber Alkylantien nur selten von der erhöhten Expression des MDR1-Gens ab^{365,366}. Die nicht-enzymatische oder die GST-katalysierte Glutathionkonjugation von Alkylantien steuert zur Entwicklung einer „Resistenz“ bei. Ende der achtziger Jahre wurde eine Erhöhung von zellulären GST- und/oder GSH-Spiegeln in Tumorzellen beobachtet. Es wird angenommen, dass dies eine Folge des durch die antineoplastische Therapie ausgelösten Selektionsdrucks ist^{367,368}. Während der letzten Jahre konnten ebenfalls die Glutathionyl-Konjugate, vorwiegend von Alkylantien der Stickstoff-Lost-Gruppe und Thiotepa, charakterisiert werden.³⁶⁹⁻³⁷¹ Bisher ließ sich eine klare Assoziation zwischen der Katalyse der Bildung von Monoglutathionyl-Chlorambucil (GSCB) bzw. - Melphalan (GSM) durch GSTA1*1 und GSTM1*1 und in geringerem Maße GSTP1*1 herstellen³⁷². Die katalytische Effizienz der GST-Enzyme der α -, μ - und π -Klasse wird durch konjugierte Glutathionprodukte (zwischen GSH und Fremdstoffen) inhibiert. Im Unterschied hierzu findet keine Hemmung der katalytischen Aktivität der GSTT1-Klasse durch gebildete Konjugate statt³⁷³.

Bedeutung von GSTT-Enzymen in der Konjugationsreaktion mit Alkylantien

GSTT1*1 katalysiert die Bildung von Monoglutathionyl-Verbindungen mit Thiotepa und Ifosfamid³⁷⁴. Bisher ist wenig über die Bedeutung von GSTT1 in Tumoren und die Entwicklung von Resistenzen bekannt. In neueren Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass der GSTT1-Polymorphismus einen Einfluss auf die Rate des Schwesterchromosomenaustauschs (SCE) hat^{340,343,344}. Aus diesen Untersuchungsergebnissen wird gefolgert, dass GSTT1 eine protektive Wirkung auf genotoxische Schäden ausübt. So könnte die Entgiftung

von Ethylenoxid, das endogen aus Ethylen gebildet wird, sowie von anderen Epoxid-Verbindungen durch GSTT1 zu einer Verringerung der SCE-Rate beitragen.

CYP1A1-Polymorphismus und ALL

In der bislang einzigen Veröffentlichung über den Zusammenhang zwischen *CYP1A1*-Polymorphismen und ALL wurde eine höhere Inzidenz des Polymorphismus m1 bei Kindern mit ALL, verglichen mit einer Kontrollgruppe, gefunden (19 % vs. 11 %).³⁶³ Während die Autoren ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für Kinder mit dem Polymorphismus m1 fanden, konnte keine Assoziation mit weiteren *CYP1A1*-Polymorphismen nachweisen. Auf Grund der geringeren Inzidenz des Polymorphismus m4 unter den weiblichen ALL-Patienten verglichen mit der Kontrollgruppe (3 % vs. 13 %), wird eine geschlechtsspezifische Schutzfunktion dieses Allels postuliert. In derselben Arbeit wurde ein ebenfalls erhöhtes Risiko für Träger des *GSTM1*-Nullgenotyps gesehen. Das gleichzeitige Auftreten des *CYP1A1*-Genotyps mit dem *GSTM1*-Nullgenotyp erhöhte das Erkrankungsrisiko zusätzlich.³⁶³

Hereditäre Polymorphismen und ALL-Rezidive im Kindesalter

Individuelle Unterschiede des Behandlungserfolgs von Kindern mit ALL-Rezidiv können zum Teil auf die pharmakogenetische Variabilität in der Bioaktivierung und Detoxifizierung von Medikamenten beruhen. Bei Kindern mit ALL-Rezidiv, die entsprechend der Therapiestudie ALL-REZ BFM behandelt wurden, konnte eine signifikante Assoziation zwischen Genotypkonstellation von Medikamenten-metabolisierenden Enzymsystemen und dem Ansprechen auf die Therapie bzw. pEFS/pSurvival gefunden werden. Kinder mit einem *CYP1A1*-Wildtypgenotyp ($n = 114$) hatten im Vergleich zum varianten *CYP1A1*-Genotyp eine signifikant bessere Responserate (83 % vs. 71 %; $p = 0.03$) und pEFS (0.28 vs. 0.07; $p = 0.0068$) sowie pSurvival (0.31 vs. 0.06; $p = 0.0003$). Signifikante Unterschiede des Ansprechens auf die Therapie und des pEFS/pSurvival konnten ebenfalls für *GSTT1* und *GSTP1* gefunden werden. Neunzig Prozent der Patienten mit homozygotem *GSTT1*0*-Genotyp ($n = 45$) erreichten eine 2. CR, im Gegensatz zu 70 % bei Patienten mit mindestens einem *GSTT1*1*-Allel ($n = 165$; $p = 0.05$). Beide Gruppen hatten deutlich unterschiedliche pEFS (0.31 vs. 0.22; $p = 0.04$) und pSurvival (0.45 vs. 0.28; $p = 0.01$). Homozygot *GSTP1*B*-Patienten ($n = 13$) zeigten analog ein besseres Ansprechen auf die Therapie (100 % vs. 80 % ($n = 103$)) und ein höheres EFS ((pEFS = 0.51 vs. 0.23; $p = 0.07$)). Die Inzidenz von homozygoter TPMT- bzw. *CYP1A1*-Defizienz war 0.9 % (1/109) bzw. 1.3 % (2/145). Weiterhin wurde eine hohe, z.T. signifikante Koinzidenz zwischen bestimmten genetischen Polymorphismen und Translokationsleukämien (*TEL-AML1*, *BCR-ABL*, *E2A-Pbx1*) gesehen, die einen kausalen Zusammenhang vermuten lassen.

Die Assoziation einer signifikant besseren pEFS/pSurvival von Kindern mit ALL-Rezidiv, die einen homozygoten *CYP1A1*-Wildtypgenotyp aufweisen, im Vergleich zu denen mit variantem *CYP1A1*-Genstatus, lässt annehmen, dass eine schnellere Detoxifizierung des Medikaments sich nachteilig auf die Responserate und dem Überleben auswirkt. Andererseits erhöht eine fehlende (z.B. homozygot *GSTT1*0*) bzw. langsamere Detoxifizierung (z.B. homozygot *GSTP1*B*) durch Enzyme der Phase II und dadurch bedingte höhere Zytostatikawirkspiegel und –dauer zwar die Toxizität gleichzeitig aber auch die pEFS und pSurvival. Die Kenntnis über die genetischen Parameter zum Zeitpunkt der Diagnose, die eine Variabilität der anti-neoplastischen Wirkung von Zytostatika mit sich bringen können, könnte zur Planung von sichereren und effektiveren Behandlungsregimen für Kinder mit ALL beitragen.

4 AUSBLICK: ALL-REZIDIVE IM KINDESALTER

Trotz der beeindruckenden Langzeitheilungschancen von Kindern mit ALL, die durch gegenwärtig angewandte, risikoadaptierte Chemotherapieprotokolle erreicht werden, erleidet ein Viertel von ihnen ein Rezidiv. Damit sind ALL-Rezidive die vierthäufigste Diagnosegruppe neoplastischer Erkrankungen im Kindesalter. Für Kinder mit einem ALL-Rezidiv liegen die Gesamtbehandlungserfolge nur bei etwa 35 %. Diese Gesamtheilungsraten verhüllen auch, dass die Heilungschancen in Abhängigkeit des biologischen ALL-Subtyps sehr variieren. Die neuen molekularen Erkenntnisse über die der Erkrankung zugrunde liegenden Biologie haben unser Wissen über die Leukämogenese erheblich erweitert. Es ist abzusehen, dass die Behandlung der ALL durch die Einführung von neuen biologiebasierten Therapien verbessert werden wird. Zu nennen ist die Entwicklung von Molekülen oder synthetischen Proteinen, die gezielt Gene an- oder ausschalten bzw. Proteine inhibieren, deren Expression/Aktivität bei Leukämien verändert sind.

Seit langem ist bekannt, dass die ALL im Kindesalter eine heterogene Erkrankung ist. Einzelne Leukämiesubgruppen lassen sich durch ihre Unterschiede in der Genexpression und der Antigenpräsentation definieren, die unterschiedliche Zelltypen und die den Differenzierungsstatus der Leukämiezellen wiedergeben. Eine weitere Unterteilung kann durch die Identifizierung von chromosomalen und genetischen Veränderungen in Leukämiezellen erfolgen. Diese schließen sowohl chromosomale Translokationen, d. h. den Austausch von großen DNA-Anteilen zwischen Chromosomen und der Bildung von chimären oder Fusionsgenen (an der Verbindungsstelle), Veränderungen der Chromosomenzahl (Hypo-; Hyperploidie) als auch Gendeletionen und Punktmutationen ein. Neben dieser biologischen Vielfalt ist das Auftreten von bestimmten ALL-Untergruppen altersabhängig. Dies könnte möglicherweise die erheblichen Unterschiede der Heilungschancen zwischen den ALL im Säuglingsalter, im Kindes- und im Erwachsenenalter erklären. Einige dieser molekularen Veränderungen sind von unabhängiger prognostischer Signifikanz.

Wie wir zeigen konnten, liefert heute bereits der Nachweis oder das Fehlen bestimmter genetischer Besonderheiten in Leukämiezellen beim ALL-Rezidiv, wie z.B. chromosomale Translokationen und/oder der daraus resultierenden Fusionstranskripte (*BCR-ABL*, *TEL-AML1*, *MLL-AF4*, *E2A-PBX1*) wesentliche Informationen über die Prognose. Dies ermöglicht eine individuellere Anpassung der Therapieintensität. Unsere Daten ergaben weiterhin, dass eine frühzeitige und zuverlässigere Abschätzung des (Folge-) Rezidivrisikos beim ALL-Rezidiv

durch die Messung des molekularen Ansprechens auf die Therapie mit dem molekulargenetischen Nachweis leukämischer Restzellen (MRD) möglich ist. Unter dem Aspekt, dass bei der Rezidivbehandlung u.U. wesentlich risikoreichere, mit einer hohen Akut- und Spättoxizität behaftete Therapieverfahren eingesetzt werden müssen, ist bei Kindern mit einem ALL-Rezidiv die möglichst sichere Abschätzung der Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Folgerezidivs zur Therapieplanung und Risikoabwägung besonders bedeutsam.

Die vollständige Aufklärung der komplexen Prozesse, die während des Übergangs vom normalen ins leukämische Zellwachstum stattfinden, benötigt eine globale und systematische Vorgehensweise. Erst durch die Sequenzierung des humanen Genoms sowie durch den technologischen Fortschritt in den molekularen Verfahren und in der Bioinformatik, die die Erzeugung und Verarbeitung von großen Datenmengen ermöglichen können, könnten die komplexen Mechanismen, die zur Entstehung einer Leukämie beitragen, aufgeklärt werden. Obwohl die Genomik erst in ihren Anfängen steckt, konnten durch die Identifizierung und die Charakterisierung von einzelnen Genen und Genexpressionsmustern bereits wichtige Erkenntnisse gewonnen werden, wodurch sich die (prä-) malignen von den normalen Zellen unterscheiden. In einigen Jahren dürfte die Mehrheit der genetischen Läsionen und Unterschiede, die für eine Neoplasie spezifisch bzw. mit dieser assoziiert sind, durch die weitere Verbesserung molekularzytogenetischer Methoden wie die SKY (*spectral karyotyping*) und M-FISH (*multicolor fluorescence hybridization*) sowie CGH- (*comparative genome hybridization*) erkannt werden. Ebenfalls könnten dann durch die *microarray*-Technologie für die verschiedenen neoplastischen Erkrankungen charakteristische Expressionsprofile (Signaturen) vorhanden sein, die zusammen mit der SNP-Technologie (*single nucleotide polymorphisms*) eine möglichst umfassende Charakterisierung des malignen Genoms erlauben.

Aus diesen enormen Datenmengen dürften Informationen über die Hoch- oder Herunterregulierung von Genen (Transcriptom) und Proteinen (Proteom) sowie der Protein-Protein-Interaktion (Interactom) erhältlich sein, die im Zusammenhang mit der onkogenen Aktivität verschiedener biologischer Prozesse stehen. Der größte Vorteil der Genomik und Proteomik für die Behandlung von Patienten mit einer ALL könnte in der Individualisierung der Diagnose und Therapie zu sehen sein. Die genaue Beschreibung einzelner und individueller Variationen würde neben der Wahl geeigneter erkrankungsspezifischer Medikamente eine effektivere Medikamentendosierung und eine zuverlässige Voraussage über den Therapieerfolg ermöglichen. Die Identifizierung von leukämieassoziierten genetischen Veränderungen werden

nicht mehr der begrenzende Faktor in der Forschung sein. Ein limitierender Faktor wird die Möglichkeit der *in vivo* Bestimmung (in einem relevanten physiologischen Zusammenhang) der relativen Bedeutung der verschiedenen transkriptionellen Ereignisse in der Leukämogenese sein. Dieser Schritt ist jedoch zur Identifizierung von molekularen Strukturen von größter Bedeutung, die ein gezieltes therapeutisches Eingreifen ermöglichen. Im Einzelnen gilt es, das onkogene Potential einer aberranten Transkriptionsfaktorexpression/-aktivität in der Tumorphogenese und die transkriptionelle Konsequenz von spezifischen aberranten Transkriptionsfaktoren aufzuklären sowie die Bedeutung eines spezifischen transkriptionellen Ereignisses für die onkogene Aktivität zu validieren.

5 PUBLIKATIONSLISTE

ERSTAUTORENSCHAFT

- | | IF |
|--|-----------|
| 1. Seeger K , Stackelberg A, Taube T, Buchwald D, Körner G, Suttorp M, Dörffel W, Tausch W, Nürnberger M, Henze G, for the Berlin-Frankfurt-Münster Study Group: Relapse of <i>TEL-AML1</i> positive acute lymphoblastic leukemia in Childhood: A matched-pair analysis. <i>J Clin Oncology</i> 19:3188-93 (2001) | 8.5 |
| 2. Seeger K , Kreuzer KA, Lass U, Taube T, Buchwald D, Eckert C, Körner G, Schmidt CA, Henze G: Molecular quantification of response to therapy and remission status in <i>TEL-AML1</i> positive childhood ALL by real-time RT-PCR. <i>Cancer Res</i> 61:1501-1506 (2001) | 8.3 |
| 3. Seeger K , Viehmann S, Buchwald D, Harbott J, Schrappe M, Stary J, Henze G, Trka J: Treatment response and residual-disease monitoring in initial and relapsed <i>TEL-AML1</i> positive childhood ALL. <i>Leukemia</i> 15:280-82 2001 | 4.3 |
| 4. Seeger K , Taube T, Eckert C, Hanel C, Pogodda M, Henze G: Unusual T-cell receptor- δ gene rearrangement patterns revealed by screening of a large series of childhood acute lymphoblastic leukemia by multiplex PCR. <i>Brit J Haematol</i> 113:318-22 (2001) | 2.8 |
| 5. Seeger K , Buchwald D, Taube T, Peter A, von Stackelberg A, Schmitt G, Kochling J, Henze G: <i>TEL-AML1</i> positivity in relapsed B cell precursor acute lymphoblastic leukemia in childhood. Berlin-Frankfurt-Munster Study Group. <i>Leukemia</i> 13:1469-70 (1999) | 3.6 |
| 6. Seeger K , Buchwald D, Peter A, Taube T, von Stackelberg A, Schmitt G, Henze G: <i>TEL-AML1</i> fusion in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. <i>Blood</i> 94:374-6 (1999) | 8.8 |
| 7. Seeger K , Eckert C, Kirschner R, Henze G, Hernáiz-Driever P: Molekulare Onkologie im Kindesalter. <i>Monatsschrift Kinderheilkunde</i> 150:924-933 (2002) | 0.7 |
| 8. Seeger K , Adams HP, Buchwald D, Beyermann B, Kremens B, Niemeyer C, Ritter J, Schwabe D, Harms D, Schrappe M, Henze G: <i>TEL-AML1</i> fusion transcript in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. The Berlin-Frankfurt-Munster Study Group. <i>Blood</i> 91:1716-22 (1998) | 8.4 |
| 9. Seeger K , Heller G: The crystal structure of 2-[2-aminophenoxy]-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolane, C ₁₂ H ₁₈ BNO ₃ . <i>Zeitschrift f Kristallographie</i> 172:105-09 (1985) | 1.7 |
| 10. Von Einsiedel H, Taube T, Hartmann R, Wellmann S, Seifert G, Henze G, Seeger K : Deletion analysis of p16 INK α and p15 INK β in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. <i>Blood</i> 99:4629-31 (2002) | 9.3 |

11. Varon R, Reis A, Henze G, Graf v. Einsiedel H, Sperling K, **Seeger K**: Mutations in the Nijmegen breakage syndrome gene (NBS1) in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Cancer Res* 61:3570-72 (2001) 8.3
12. Von Einsiedel H, Taube T, Hartmann R, Eckert C, Wellmann S, Henze G, **Seeger K**: Prognostic value of p16INK4a gene deletions in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 97:4002-4 (2001) 9.3
13. Wellmann S, Taube T, Paal K, v. Einsiedel H, Geilen W, Seifert G, Eckert C, Henze G, **Seeger K**: Specific reverse transcription-PCR quantification of vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants by LightCycler technology. *Clin Chem* 47:654-60 (2001) 4.4
14. Korte A, Kochling J, Badiali L, Eckert C, Andreae J, Geilen W, Kebelmann-Betzing C, Taube T, Wu S, Henze G, **Seeger K**: Expression analysis and characterization of alternatively spliced transcripts of human IL-7Ralpha chain encoding two truncated receptor proteins in relapsed childhood ALL. *Cytokine* 12:1597-608 (2001) 2.5
15. Kebelmann-Betzing C, Korner G, Badiali L, Buchwald D, Moricke A, Korte A, Kochling J, Wu S, Kappelmeier D, Oettel K, Henze G, **Seeger K**: Characterization of cytokine, growth factor receptor, costimulatory and adhesion molecule expression patterns of bone marrow blasts in relapsed childhood B cell precursor ALL. *Cytokine* 13:39-50 (2001) 2.0
16. Korte A, Moricke A, Beyermann B, Kochling J, Taube T, Kebelmann C, Henze G, **Seeger K**: Extensive alternative splicing of interleukin-7 in malignant hematopoietic cells: implication of distinct isoforms in modulating IL-7 activity. *J Interferon Cytokine Res* 19:495-503 (1999) 2.2
17. Von Einsiedel H, Taube T, Beyermann B, Dragon S, Moricke A, Kebelmann-Betzing C, Köchling J, Henze G, **Seeger K**: Absence of Mutations in the CDKI binding site of CDK4 in childhood ALL. *Leuk Lymphoma* 40:413-7 (2001) 1.3
18. Riebel T, Kebelmann-Betzing C, Sarioglu N, Wit J, **Seeger K**: Unusual mesoblastic nephroma in a young child. *Pediatr Radiol* 33:62-5 (2003) 0.8
19. Heller G, **Seeger K**: Mixed esters of boric acid with amino alcohols and diols. Z. Naturforsch 43b:547-556 (1988) 1.5

KO-AUTORENSCHAFT:

20. Eckert C, Biondi A, **Seeger K**, Cazzaniga G, Hartmann R, Pogoda M, Proba J, Henze G: Prognostic value of minimal residual disease in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 358:1239-41 (2001) 13.3
21. Kebelmann-Betzing C, **Seeger K**, Wolf R, Henze G: Traumatic lumbar puncture at diagnosis and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 98:3496- 9.3

- 7 (2001)
22. Kebelmann-Betzing C, **Seeger K**, Kulozik A, Henze G, Liehr T, Heller A, Teigler-Schlegel A: Secondary acute myeloid leukemia after treatment of acute monoblastic leukemia. *N Engl J Med* 343:1897-8 (2000) 29.5
 23. Kebelmann-Betzing C, **Seeger K**, Dragon S, Schmitt G, Moricke A, Henze G, Beyersmann B: Advantages of a new Taq DNA polymerase in multiplex PCR and time-release PCR. *Biotechniques* 24:154-8 (1998) 1.7
 24. Taube T, **Seeger K**, Beyersmann B, Hanel C, Duda S, Linderkamp C, Henze G: Multiplex PCR for simultaneous detection of the most frequent T cell receptor-delta gene rearrangements in childhood ALL. *Leukemia* 11:1978-82 (1997) 3.2
 25. Schutt S, **Seeger K**, Henze G: Clinical applications of the study of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in acute leukemia and non-Hodgkin's lymphoma in children. *Klin Padiatr* 202:218-23 (1990) 0.3
 26. Schutt S, **Seeger K**, Schmidt C, Siegert W, Henze G: Immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma. *Hamatol Bluttransfus* 33:56-61 (1990) 0.2
 27. Eckert C, Landt O, Taube T, **Seeger K**, Beyersmann B, Proba J, Henze G: Potential of LightCycler technology for quantification of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 14:316-23 (2000) 3.7
 28. Beyersmann B, Agthe AG, Adams HP, **Seeger K**, Linderkamp C, Goetze G, Ludwig WD, Henze G: Clinical features and outcome of children with first marrow relapse of acute lymphoblastic leukemia expressing BCR-ABL fusion transcripts. BFM Relapse Study Group. *Blood* 87:1532-8 (1996) 9.7
 29. Schmidt CA, Przybylski G, **Seeger K**, Siegert W: TCR delta gene rearrangements in acute myeloid leukemia with T-lymphoid antigen expression. *Leuk Lymphoma* 20:45-9 (1995) 0.8
 30. Schmidt CA, Neubauer A, **Seeger K**, Rochlitz CF, Binder T, Oettle H, Henze G, Liu ET, Huhn D, Siegert W: Detection of allelic loss within the beta 1-interferon gene in childhood acute lymphoblastic leukemia using differential PCR. *Ann Hematol* 68:171-4 (1994) 1.2
 31. Schmidt CA, Przybylski G, Oettle H, **Seeger K**, Ludwig WD, Siegert W: Heterogeneity of V delta 2 TCR delta gene rearrangements in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 16:73-7 (1994) 0.8
 32. Baumgarten E, Herbst H, Schmitt M, **Seeger K**, Schulte-Overberg U, Henze G: Life-threatening infectious mononucleosis: is it correlated with virus-induced T cell proliferation? *Clin Infect Dis* 19:152-6 (1994) 2.9
 33. Schmidt CA, Oettle H, Neubauer A, **Seeger K**, Thiel E, Huhn D, Siegert W, Ludwig WD: Rearrangements of T-cell receptor delta, gamma and beta genes in acute

- myeloid leukemia coexpressing T-lymphoid features. *Leukemia* 6:1263-7 (1992)
34. Prokop A, Wieder T, Sturm I, Essmann F, **Seeger K**, Wuchter C, Ludwig WD, Henze G, Dorken B, Daniel PT: Relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia is associated with a decrease of the Bax/Bcl-2 ratio and loss of spontaneous caspase-3 processing in vivo. *Leukemia* 14:1606-13 (2000) 3.7
35. Hannen M, Banning U, Bonig H, Kim YM, Shin DI, Lorenz I, **Seeger K**, Korholz D: Cytokine-mediated regulation of granulocyte colony-stimulating factor production. *Scand J Immunol* 50:461-8 (1999) 1.7
36. Burmeister T, Maurer J, Aivado M, Elmaagacli AH, Grunebach F, Held KR, Hess G, Hochhaus A, Hoppner W, Lentjes KU, Lubbert M, Schafer KL, Schafhausen P, Schmidt CA, Schuler F, **Seeger K**, Seelig R, Thiede C, Viehmann S, Weber C, Wilhelm S, Christmann A, Clement JH, Ebener U, Enczmann J, Leo R, Schleuning M, Schoch R, Thiel E: Quality assurance in RT-PCR-based BCR/ABL diagnostics-results of an interlaboratory test and a standardization approach. *Leukemia* 14:1850-6 (2001) 3.7

Summe Impact factor Punkte: 175.7

6 VORTRÄGE UND POSTER

VORTRÄGE

ASH, American Society of Hematology 41st Annual Meeting, 1999, New Orleans

1. **K. Seeger**, C. Hanel, C. Tillmann, G. Schmitt, L. Badiali, H. Schmid, J. Proba, G. Henze: Significance of genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes for therapy and outcome of children with relapsed B-cell precursor ALL.

ASH, American Society of Hematology 39th Annual Meeting, 1997, San Diego

2. **Seeger K**, Buchwald D, Beyermann B, Adams HP, Köchling J, Schmid H, Niemeyer C, Janka G, Henze G: *TEL-AML1* fusion transcript in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). Blood 1997, 90 Suppl 1:560a

SIOP, Société internationale d'oncologie pédiatrique, 1999, Montreal

3. **Seeger K**, Buchwald D, Stackelberg A, Taube T, Schmitt G, Paal K, Henze G: Prospective analysis of *TEL-AML1* fusion in relapsed childhood ALL
4. Eckert C, Landt O, **Seeger K**, Beyermann B, Taube T, Paal K, Henze G: Quantitative detection of minimal residual disease by LightCycler technology

4th International Symposium on Drug Resistance in Leukemia/Lymphoma, 2001, Amsterdam

5. **Seeger K**, M. Czeh, C. Tillmann, O. Maierova, M. Mogl, C. Hanel, and G. Henze: Effect of phase I drug-metabolizing enzyme variants on outcome of children with relapsed B-cell precursor ALL. Leukemia

GPOH, 57. Wissenschaftliche Halbjahrestagung der GPOH, 2001, Frankfurt

6. **Seeger K**, Maierova O, Czeh M, Henze G: Impact of genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes on therapy and outcome of children with relapsed acute lymphoblastic leukemia
7. Eckert C, **Seeger K**, Hartmann R, Henze G: Predictive value of MRD for stratification of therapy in childhood ALL at relapse.

GPOH, 50. Wissenschaftliche Halbjahrestagung Berlin 1997, Frankfurt

8. **Seeger K**, Adams HP, Buchwald D, Henze G: *TEL-AML1*, ein neuer Stratifizierungsfaktor in der Behandlung von Kindern mit Rezidiv einer akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL)

Reisenburg/Ulm Oct 24-26 1999

9. **Seeger K**: Treatment response and residual-disease monitoring in initial and relapsed *TEL-AML1* positive childhood ALL

4th Int. Symposium on Cytostatic Drug Resistance, Sept 25-27, 1997, Berlin

10. **Seeger K**, Beyermann B, Adams HP, Hanel C, Schmitt G, Henze G: Glutathione S-transferase (GST) GSTT1 and GSTM1 genotypes at first relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL)

München 2000

11. Seifert G, Taube T, Schroff M, Knies F, Paal K, Wellmann S, Einsiedel H, Wittig B, Henze G, **Seeger K**: Improved stability of DNazymes by a circular structure.

BFM Plenartagung, 2000, Lübeck

12. **Seeger K**: Significance of genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes for therapy and outcome of children with relapsed B-cell precursor ALL (BCP-ALL)

Eilat, Israel 1999

13. **Seeger K**, Paal K, Buchwald D, Taube T, Beyermann B, Kebelmann C, Köchling J, Möricke A, Peter A, Schmitt G, Badiali L, Henze G: *ETV6-CBFA2* positive childhood ALL is associated with no or low expression of *MDR1*
14. Taube T, Möricke A, Beyermann B, Dragon S, Schmitt G, Hanel C, Fahrion O, Kebelmann-Betzing C, Korte A, Henze G, **Seeger K**: mRNA expression, screening for point mutations and identification of a truncated variant of gp130 in childhood ALL
15. Korte A, **Seeger K**, Möricke A, Beyermann B, Köchling J, Taube T, Kebelmann-Betzing C, Henze G: High diversity of splicing-derived interleukin-7 isoforms in acute lymphoblastic leukemia. *Hematologia* 1999, 84(EHA4):8

IBFM, 11th Annual meeting of the Int. Berlin-Frankfurt-Münster Study Group, 2000, Groningen

16. **Seeger K**: Single nucleotide polymorphisms and drug-metabolization.

IBFM, 10th Ann. Meeting of the Int. Berlin-Frankfurt-Münster Study Group, 1999, Monza

17. **Seeger K**: TEL/AML1, an independent risk factor for children with ALL relapses

IBFM, 9th Ann. Meeting of the Int. Berlin-Frankfurt-Münster Study Group, 24.-26.4.1998, Ittingen

18. Adams HP, **Seeger K**, Beyermann B, Buchwald D, Kremens B, Niemeyer C, Ritter J, Schwabe D, Harms D, Schrappe M, Henze G: Informational value of *TEL-AML1* fusion transcripts in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia.

12. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung, 2001, Wilsede

19. Guggemos A, C. Eckert, C. Hanel, G. Henze, **Seeger K**: First extensive comparative analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements between first and second relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia shows reasonable stability of clonal markers for MRD monitoring:
20. Seifert G, Taube T, Knies F, Henze G, **Seeger K**: Development of optimized and stabilized bcr-abl (e1e2) specific DNazymes

21. Graf Einsiedel H, Taube T, Hartmann R, Isaksson M, Eckert C, Wellmann S, Seifert G, Henze G, **Seeger K**: Assessment of *p15INK4b* inactivation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL)
- 12. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung, 2000, Wilsede*
22. Einsiedel H Graf von, Landt O, Eckert C, Taube T, Wellmann S, Paal K, Geilen W, Henze G, **Seeger K**: The role of the tumor-suppressor genes p15INK4b, p16INK4a and p19ARF in relapsed childhood ALL: a deletion screening of 170 patients with a novel real-time PCR approach (abstract). *Klin Pädiatr* 2000, 212:234
 23. Maiorova OA, Mogl MT, Eckert C, Hanel C, Proba J, Badiali L, Henze G, **Seeger K**: CYP2D6, CYP3A4 and NQO1 polymorphisms in childhood ALL (abstract). *Klin Pädiatr* 2000, 212:240
 24. Mogl MT, Eckert C, Maiorova OA, Körner G, Götze G, Keune W, Henze G, **Seeger K**: Detection of genetic polymorphisms of NQO1 by LightCycler technology (abstract). *Klin Pädiatr* 2000,212:241
 25. Wellmann S, Beyermann B, Peter A, Körner G, Einsiedel H Graf von, Taube T, Henze G, **Seeger K**: Development of a fluorescence in situ hybridization method for the detection of mRNA molecules coding for interleukin-2 and interleukin-2 receptor (abstract). *Klin Pädiatr* 2000, 212:248
- 11. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung, 1999, Wilsede*
26. **Seeger K**, Kreuzer KA, Buchwald D, Taube T, Lass U, Schmitt G, Köchling J, Schmidt CA, Henze G: Novel 5'exonuclease-based real-time PCR assay for the detection of *TEL-AML1* fusion in childhood ALL. *Klin Pädiatr* 1999, 211:377
 27. Eckert C, Landt O, **Seeger K**, Beyermann B, Proba J, Taube T, Paal K, Henze G: Real time PCR - quantitative detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia by lightcycler(TM) technology. *Klin Pädiatr* 1999, 211:364
- 10. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung, 1998, Wien*
28. **Seeger K**, Taube T, Henze G: Unusual TCRdelta gene rearrangements patterns in childhood ALL revealed by multiplex PCR.
 29. Kebelmann-Betzing C, **Seeger K**, Beyermann B, Schmitt G, Möricke A, Badiali L, Henze G: Cytokine and cytokine-receptor gene expression pattern in leukemic blasts of children with ALL/My+ALL. *Klin Pädiatr* 1998,210:317
 30. Möricke A, **Seeger K**, Schmitt G, Kebelmann-Betzing C, Korte A, Taube T, Beyermann B, Henze G: Enhanced expression of an alternatively spliced IL-4Ralpha transcript resulting from delayed sample preparation. *Klin Pädiatr* 1998,210:319
- 9. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung, 1997, Wilsede*
31. **Seeger K**, Buchwald D, Adams HP, Beyermann B, Möricke A. Persistent high frequency of TEL-AML1 in first marrow relapse of childhood B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Klin Pädiatr* 1997, 209:294
 32. Taube T, **Seeger K**: Simultaneous detection of various TCRdelta gene rearrangements in childhood ALL by multiplex PCR.

33. Kebelmann-Betzing C, Möricke A, Beyermann B, **Seeger K**, Schmitt G, Henze G: Multiplex RT-PCR Monitoring for detection of mRNA-Expression of different interleukins. *Klin Pädiatr* 1997, 208:263
 34. Beyermann B, **Seeger K**, Linderkamp C, Hanel C, Goetze G, Henze G. Monitoring of MRD at relapse of childhood ALL.
- 8. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung, 1996, Wilsede*
35. Möricke A, **Seeger K**, Dragon S, Kebelmann-Betzing C, Schmitt G, Beyermann B, Henze G. Detection of an novel alternatively spliced transcript of the human interleukin-4 receptor alpha chain in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Klin Pädiatr* 1996,209:290
 36. **Seeger K**, S Duda, T Taube, C Linderkamp, C Hanel, B Beyermann, G, Henze Simultaneous detection of various TCR d gene rearrangements in childhood ALL by multiplex PCR. *Klin Pädiatr* 1996,208:254
- 1st International symposium on cytokines and cytokine receptors, 1997, Berlin*
37. **Seeger K**: Zytokine und Zytokin-Rezeptoren.
- 23. Kongreß der deutsche Krebsgesellschaft, 1998, Berlin*
38. **Seeger K**, Fahron O, Beyermann B, Pettersen M, Hanel C, Schmitt G, Henze G: Glutathione S-transferase (GST) GSTT1 and GSTM1 genotypes and *in vitro* drug resistance in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia.

POSTER

ASH, American Society of Hematology 42nd Annual Meeting, Dec 1-5, 2000, San Francisco

1. **Seeger K**, Tillmann C, Maiorova O, Mogl M, Czeh M, Hanel C, Schmid H, Henze G: Synergistic effect of CYP1A1 and GSTP1 polymorphisms on outcome of children with relapsed B-cell precursor ALL (abstract). *Blood* 2000,96 Suppl 1:712a-713a
2. **Seeger K**, Wu S, Kebelmann-Betzing C, Hanel C, Schmid H, Henze G: Different cytokine gene expressions in BM samples from initial and relapsed childhood ALL (abstract). *Blood* 2000,96 Suppl 1:167b
3. Seifert G, Taube T, Schroff M, Paal K, Wellmann S, Graf v Einsiedel H, Eckert C, Wittig B, Henze G, **Seeger K**: Stability and catalytic activity of novel circular DNazymes (abstract). *Blood* 2000,96 Suppl 1:432a
4. Maiorova O, Mogl M, Eckert C, Taube T, Schmid H, Proba J, Henze G, **Seeger K**: Genetic polymorphism of CYP3A4 in childhood ALL (abstract). *Blood* 2000,96 Suppl 1:714a
5. Wellmann S, Taube T, Paal K, Graf v Einsiedel H, Geilen W, Eckert C, Seifert G, Henze G, **Seeger K**: Specific quantification of VEGF splice variants and total VEGF in malignancies and normal tissues by real-time RT-PCR (abstract). *Blood* 2000,96 Suppl 1:168b

6. Wu S, Andreae J, Korte A, Hanel C, Koechling J, Schmid H, Henze G, **Seeger K**: Prednisolone inhibits the expression of cytokines and surface adhesion molecules of human bone marrow stroma cells in childhood ALL (abstract). Blood 2000,96 Suppl 1:169b
7. Einsiedel H Graf von, Isaksson M, Hartmann R, Taube T, Eckert C, Wellmann S, Seifert G, Paal K, Geilen W, Henze G, **Seeger K**: Prognostic value of p15INK4b promotor methylation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia (abstract). Blood 2000,96 Suppl 1:188b
8. Taube T, Eckert C, Körner G, Peter A, GrafVEinsiedel H, Schmid H, Henze G, **Seeger K**: Real-time quantitative RT-PCR for detection of minimal residual disease in TEL-AML1 positive childhood ALL. Comparison with established DNA-based technique (abstract). Blood 2000,96 Suppl 1:199b
9. Eckert C, Biondi A, **Seeger K**, Cazzaniga G, Hartmann R, Proba J, D'Aniello E, Beyer-mann B, Seifert G, Henze G: Prognostic value of minimal residual disease in relapsed childhood ALL (abstract). Blood 2000,96 Suppl 1:315a
10. C. Eckert, Biondi A, **Seeger K**, Cazzaniga G, Hartmann R, Proba J, D'Aniello E, Beyer-mann B, Seifert G, Henze G: Minimal residual disease in relapsed childhood ALL: demonstration of heterogeneity in stratification group S2. Blood 2000, 96 Suppl 1:188b
11. Daniel DT, Prokop A, Wieder T, Sturm I, Essmann F, **Seeger K**, Wuchter C, Ludwig WD, Dörken B, Henze G:
Relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia is associated with a decrease of the BAX/BCL-2 ration and loss of spontaneous caspase-3 procession in vivo. Blood 2000, 96 Suppl 1:113a
12. Maiorova O, Becker M, **Seeger K**, Henze G: Dynamic assesment of liver function in children with ALL (abstract). Blood 2000, 96 Suppl 1:320a
13. Köchling J, KönigMerediz SA, Wittig B, Stripecke R, Korte A, **Seeger K**, Taube T, Wu S, Schmid H, Henze G: In-vivo transfection of murine skin with a novel expression vector encoding BCR-ABL breakpoint specific peptides prevents Ph+ ALL. Blood 2000,96 Suppl 1:800a

ASH, American Societ of Hematology 41th Annual Meeting, Dec 3-7, 1999, New Orleans

14. **Seeger K**, C. Hanel, C. Tillmann, G. Schmitt, L. Badiali, H. Schmid, J. Proba, G. Henze: Significance of genetic polymorphisms of drug metabolizing enzymes for therapy and outcome of children with relapsed B-cell precursor ALL.
15. **Seeger K**, S. Wu, J. Kochling, T. Taube, W. Geilen, D. Buchwald, H.J. Schmid, G. Henze: Bone marrox stomal and lymphoblastic cells show distinct catokine gene expressions and differential responses to SCF and IL-7 in childhooo ALL.
16. Korte A, Badiali L, Köchling J, Schmid H, Geilen W, Eckert C, Kebelmann-Betzing C, Henze G, **Seeger K**: IL-7Ra expression of leukemic cells and identification of two alternatively spliced transcripts encoding different truncated IL-7Ra proteins in childhood ALL. Blood 1999,94:72a
17. Kebelmann-Betzing C, Schmitt G, Badiali L, Buchwald D, Möricke A, Köchling J, Wu S, Korte A, Schmid H, Henze G, **Seeger K**: Cytokine, growth factor receptor, costimulatory and adhesion molecule expression pattern in relapsed childhood B-cell precursor ALL bone marrow blasts. Blood 1999,94:220b

18. Wu S, Kebelmann-Betzing C, Eckert C, Oettel K, Kappelmayer D, Badiali L, Korte A, Schmid H, Henze G, **Seeger K**: High IL-10/VEGF and low IL-7/IL-15 gene expression in BM lymphoblasts in relapsed childhood ALL using real-time PCR Technique.
19. Peter A, Schmitt G, Buchwald D, Taube T, Kebelmann-Betzing C, Schmid H, Henze G, **Seeger K**: Extensive analysis of TEL-AML1 positive and TEL-AML1 negative childhood ALL at relapse by FISH.
20. Eckert C, Taube T, Landt O, Paal K, Proba J, **Seeger K**, Schmid H, Henze G: Quantitative real-time PCR for MRD detection, is any detection system preferable?

ASH, American Society of Hematology. 40th Annual Meeting, Dec 4-8, 1998 Miami Beach

21. **Seeger K**, Kreuzer KA, Schmidt CA, Buchwald D, Lass U, Schmitt G, Taube T, Köchling J, Beyermann B, Huhn D, Henze G: Novel 5'exonuclease-based real-time PCR assay for the detection of TEL-AML1 fusion in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood* 1998,92:Suppl 1
22. Taube T, Möricke A, v. Einsiedel H, Dragen S, Fahrion O, Beyermann B, Korte A, Hanel C, Kebelmann-Betzing C, Schmitt G, Schmid H, Henze G, **Seeger K**: mRNA expression, absence of point mutations and identification of a previously unknown shortened isoform of the beta subunit common to the GM-CSF, IL-3 and IL-5 receptor in ALL. *Blood* 1998, 92,Suppl 1,175b
23. Beyermann B, **Seeger K**, Adams HP, Linderkamp C, Taube T, Schmid H, Hanel C, Henze G: Dynamics of minimal residual disease in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1998,92:Suppl 1
24. Beyermann B, Becker M, Wernicke C, Harbott J, Schmid H, **Seeger K**, Henze G, Witkowski R, Thiel G: High frequency of chromosomal imbalances in relapsed childhood T-cell ALL revealed by comparative genomic hybridization. *Blood* 1998,92:Suppl 1

ASH, American Society of Hematology. 39th Annual Meeting, Dec 5-9, 1997, San Diego

25. **Seeger K**, Buchwald D, Beyermann B, Adams HP, Köchling J, Schmid H, Niemeyer C, Janka G, Henze G: TEL-AML1 fusion transcript in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL)
26. Beyermann B, **Seeger K**, Linderkamp C, Taube T, Schmid H, Hanel C, Henze G: Dynamics of minimal residual disease in initial and relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1997, 90 Suppl 1:183a

SIOP, 31st Meeting of the International Society of Ped. Oncology, Oct 4-7, 2001, Brisbane

27. **Seeger K**, v. Stackelberg A, Taube T, Buchwald D, Körner G, Suttorp M, Dörffel W, Tausch W, Henze G: Relapse of TEL-AML1 positive Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) in Childhood: A Matched-pair Analysis
28. Wu S, C. Kebelmann-Betzing, A. Korte, G. Henze, **Seeger K**: Bone marrow stromal and lymphonlastic cells show distinct cytokine gene expressions and different responses to exogenous IL-7 in childhood ALL.

SIOP, 30th Meeting of the International Society of Ped. Oncology, Oct 4-8, 1998, Yokohama

29. **Seeger K**, Buchwald D, Köchling J, Beyermann B, Möricke A, Schmitt G, Hanel C, Götz G, Henze G: CBFA2/ETV6 fusion in ETV6/CBFA2 positive childhood ALL. *Med Ped Oncol* 31:295, 1998
30. Kebelmann-Betzing C, **Seeger K**, Beyermann B, Schmitt G, Badiali L, Henze G: Expression of human IL-15, IL-15 splice variant, and IL-15 receptor complex in childhood ALL and normal blood. *Med Ped Oncol* 1998,31:333
31. Dragon S, Beyermann B, **Seeger K**, Hanel C, Schmitt G and Henze G PCR-SSCP Analysis of p53 Mutations in Relapsed Childhood BCR-ABL-positive acute lymphoblastic leukemia
32. Beyermann B, Kebelmann-Betzing C, Anderer U, **Seeger K**, Nagel S, Schmitt G, Möricke A, Dragon S, Henze G:
Expression of IL15 mRNA and its isoform in childhood solid tumors.
SIOP, 29th Meeting of the International Society of Ped. Oncology, Sept 23-27, 1997, Istanbul
33. **Seeger K**, Taube T, Duda S, Linderkamp C, Hanel C, Beyermann B, Henze G. Multiplex PCR for simultaneous detection of frequent TCR δ gene rearrangements in childhood ALL. *Med Pediatr Oncol* 1997, 29:389
2nd Minimal residual disease symposium, 2000, Marseille
34. Taube T, C Eckert, G Körner, G Henze, **Seeger K**:
Real-time quantitative RT-PCR for detection of minimal residual disease in Tel-Aml1 positive childhood ALL - Comparison with established DNA-based technique
35. Eckert C, Biondi A, **Seeger K**, Cazzaniga G, Hartmann R, Pogodda M, Hanel C, D'Aniello E, VonStackelberg A, Henze G: Early molecular response indicates a favorable prognosis in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia (Abstract). 2nd International Symposium on Minimal Residual Disease, 16.-17. März 2001, Marseille, France, *Abstr Vol (2001)* 86

7 BUCHBEITRÄGE

1. Wegner RD, **Seeger K**: Zyto- und Molekulargenetik. Instand Schriftenreihe, Band 7. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg 1991
2. **Seeger K**, Schütt S, Heinze G, Bühre C, Schmidt CA, Drakoulis N, Henze G: Specific and sensitive detection of CMV DNA in clinical specimens by polymerase chain reaction. In Usage of polymerase chain reaction in genetic and infectious diseases. Springer Verlag, Berlin - New York - Tokio, p125-129, 1990
3. Drakoulis N, **Seeger K**, Groß D, Schütt S, Groß K, Vasiliades C, Brockmöller J, Roots I: Determination of glutathione S-transferase μ genotype in humans by PCR-amplified gene probes. In Usage of polymerase chain reaction in genetic and infectious diseases. Springer Verlag, Berlin - New York - Tokio, p95-98,1990

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

gemäß Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, dass:

- keine staatsanwaltlichen Ermittlungsverfahren gegen mich abhängig sind.
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte.
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst und die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind.
- dass mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....
Datum

.....
Unterschrift

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Günter Henze bin ich für die Unterstützung meiner wissenschaftlichen Arbeit und klinischen Ausbildung an der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie / Hämatologie der Charité sehr zu dank verpflichtet.

Unserem *wissenschaftlichen Team* Alex Förster, Claudia Hanel, Cornelia Eckert, Gabriele Körner, Gisela Götze, Lucia Badiali, Madlen Pfau, Michaela Heide, Renate Kirschner, Shuling Wu, Sven Wellmann, Tillmann Taube, Torsten Kühl und Wilhelmine Keune sowie den *Doktoranden/-innen*, die eine wesentliche Stütze unseres Labors bilden und bildeten: Anita Peter, Anja Möricke, Christian Kebelmann-Betzing, Dirk Buchmann, Georg Seifert, Hagen Graf von Einsiedel, Alexander Korte, Günther Heinze, Tobias Reindl und Serge Dragon danke ich für die enge Zusammenarbeit, fruchtbare Diskussions und ihren unermüdlichen Einsatz. Ohne ihrer aktiven Hilfe, Einsatz, Expertise und experimentelle Arbeit wäre die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Den Ärzten und Schwestern der einsendenden Kliniken, die an der Studie zur Behandlung von Kindern mit ALL-Rezidiv teilnehmen, möchte ich für ihre Mitarbeit danken.

Ein besonderer Dank gilt meiner ehemaligen Kollegin und Lebenspartnerin Silvia Schütt, die nicht nur am Aufbau des molekulargenetischen Labors und damit am Zustandekommen dieser Arbeit einen hohen Anteil hat. Ihr und unserem Sohn Justus danke ich für ihre Geduld und Unterstützung sowie für die Möglichkeit am nicht wissenschaftlichen Leben teilzuhaben.

Berlin, im Februar 2003

Karl Seeger

8 REFERENZEN

1. Conter V, Arico M, Valsecchi MG, Basso G, Biondi A, Madon E, Mandelli F, Paolucci G, Pession A, Rizzari C, Rondelli R, Zanesco L, Masera G. Long-term results of the Italian Association of Pediatric Hematology and Oncology (AIEOP) acute lymphoblastic leukemia studies, 1982-1995. *Leukemia*. 2000;14:2196-2204.
2. Schrappe M, Reiter A, Zimmermann M, Harbott J, Ludwig WD, Henze G, Gadner H, Odenwald E, Riehm H. Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. Berlin-Frankfurt-Munster. *Leukemia*. 2000;14:2205-2222.
3. Gaynon PS, Trigg ME, Heerema NA, Sensel MG, Sather HN, Hammond GD, Bleyer WA. Children's Cancer Group trials in childhood acute lymphoblastic leukemia: 1983-1995. *Leukemia*. 2000;14:2223-2233.
4. Harms DO, Janka-Schaub GE. Co-operative study group for childhood acute lymphoblastic leukemia (COALL): long-term follow-up of trials 82, 85, 89 and 92. *Leukemia*. 2000;14:2234-2239.
5. Kamps WA, Veerman AJ, van Wering ER, van Weerden JF, Slater R, van der Does-van den Berg A. Long-term follow-up of Dutch Childhood Leukemia Study Group (DCLSG) protocols for children with acute lymphoblastic leukemia, 1984-1991. *Leukemia*. 2000;14:2240-2246.
6. Silverman LB, Declerck L, Gelber RD, Dalton VK, Asselin BL, Barr RD, Clavell LA, Hurwitz CA, Moghrabi A, Samson Y, Schorin MA, Lipton JM, Cohen HJ, Sallan SE. Results of Dana-Farber Cancer Institute Consortium protocols for children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia (1981-1995). *Leukemia*. 2000;14:2247-2256.
7. Vilmer E, Suciu S, Ferster A, Bertrand Y, Cave H, Thyss A, Benoit Y, Dastugue N, Fournier M, Souillet G, Manel AM, Robert A, Nelken B, Millot F, Lutz P, Rialland X, Mechinaud F, Boutard P, Behar C, Chantaine JM, Plouvier E, Laureys G, Brock P, Uyttebroeck A, Marguerite G, Plantaz D, Norton L, Francotte N, Gyselinck J, Waterkeyn C, Solbu G, Philippe N, Otten J. Long-term results of three randomized trials (58831, 58832, 58881) in childhood acute lymphoblastic leukemia: a CLCG-EORTC report. Children Leukemia Cooperative Group. *Leukemia*. 2000;14:2257-2266.
8. Gustafsson G, Schmiegelow K, Forestier E, Clausen N, Glomstein A, Jonmundsson G, Mellander L, Makierna A, Nygaard R, Saarinen-Pihkala UM. Improving outcome through two decades in childhood ALL in the Nordic countries: the impact of high-dose methotrexate in the reduction of CNS irradiation. Nordic Society of Pediatric Haematology and Oncology (NOPHO). *Leukemia*. 2000;14:2267-2275.
9. Maloney KW, Shuster JJ, Murphy S, Pullen J, Camitta BA. Long-term results of treatment studies for childhood acute lymphoblastic leukemia: Pediatric Oncology Group studies from 1986-1994. *Leukemia*. 2000;14:2276-2285.
10. Pui CH, Boyett JM, Rivera GK, Hancock ML, Sandlund JT, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Behm FG, Raimondi SC, Gajjar A, Razzouk B, Campana D, Kun LE, Relling MV, Evans WE. Long-term results of Total Therapy studies 11, 12 and 13A for childhood acute lymphoblastic leukemia at St Jude Children's Research Hospital. *Leukemia*. 2000;14:2286-2294.
11. Tsuchida M, Ikuta K, Hanada R, Saito T, Isoyama K, Sugita K, Toyoda Y, Manabe A, Koike K, Kinoshita A, Maeda M, Ishimoto K, Sato T, Okimoto Y, Kaneko T, Kajiwara M, Sotomatsu M, Hayashi Y, Yabe H, Hosoya R, Hoshi Y, Ohira M, Bessho F, Tsunematsu Y, Tsukimoto I, Nakazawa S. Long-term follow-up of childhood acute lymphoblastic leukemia in Tokyo Children's Cancer Study Group 1981-1995. *Leukemia*. 2000;14:2295-2306.
12. Eden OB, Harrison G, Richards S, Lilleyman JS, Bailey CC, Chessells JM, Hann IM, Hill FG, Gibson BE. Long-term follow-up of the United Kingdom Medical Research Council protocols for childhood acute lymphoblastic leukaemia, 1980-1997. Medical Research Council Childhood Leukaemia Working Party. *Leukemia*. 2000;14:2307-2320.
13. Dordelmann M, Reiter A, Borkhardt A, Ludwig WD, Gotz N, Viehmann S, Gadner H, Riehm H, Schrappe M. Prednisone response is the strongest predictor of treatment outcome in infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1999;94:1209-1217.
14. Cave H, van der Werff ten Bosch J, Suciu S, Guidal C, Waterkeyn C, Otten J, Bakkus M, Thielemans K, Grandchamp B, Vilmer E. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer--Childhood Leukemia Cooperative Group. *N Engl J Med*. 1998;339:591-598.
15. van Dongen JJ, Seriu T, Panzer Grumayer ER, Biondi A, Pongers Willemse MJ, Corral L, Stolz F, Schrappe M, Masera G, Kamps WA, Gadner H, van Wering ER, Ludwig WD, Basso G, de Bruijn MA, Cazzaniga G, Hettinger K, van der Does van den Berg A, Hop WC, Riehm H, Bartram CR. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet*. 1998;352:1731-1738.
16. Coustan-Smith E, Behm FG, Sanchez J, Boyett JM, Hancock ML, Raimondi SC, Rubnitz JE, Rivera GK, Sandlund JT, Pui CH, Campana D. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 1998;351:550-554.

17. ALL-BFM. 2000: Multizentrische kooperative Studie zur Behandlung von Kindern mit einer akuten lymphoblastischen Leukämie. Studienleitung: Prof. Dr. M. Schrappe, MHH-Hannover, Hannover, Deutschland.
18. Henze G, Fengler R, Hartmann R, Kornhuber B, Janka Schaub G, Niethammer D, Riehm H. Six-year experience with a comprehensive approach to the treatment of recurrent childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL-REZ BFM 85). A relapse study of the BFM group. *Blood*. 1991;78:1166-1172
19. Henze G, Fengler R, Hartmann R. Chemotherapy for relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia: Results of the BFM Study Group. *Haematol Blood Transfus*. 1994;36:374-379
20. Henze G, Fengler R, Hartmann R, Dopfer R, Gobel U, Graf N, Jurgens H, Niethammer D, Ritter J, Schellong G, et al. Chemotherapy for bone marrow relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1989;24
21. ALL-REZ. BFM Pilot 02: Multizentrische kooperative Studie zur Behandlung von Kindern mit Rezidiv einer akuten lymphoblastischen Leukämie. Studienleitung: Prof. Dr. Dr. h.c. G. Henze, Charité Campus Vrichow Klinikum, HU zu Berlin, Berlin, Deutschland.
22. Eckert C, Biondi A, Seeger K, Cazzaniga G, Hartmann R, Beyermann B, Pogodda M, Proba J, Henze G. Prognostic value of minimal residual disease in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2001;358:1239-1241.
23. Harbott J, Viehmann S, Borkhardt A, Henze G, Lampert F. Incidence of TEL/AML1 fusion gene analyzed consecutively in children with acute lymphoblastic leukemia in relapse. *Blood*. 1997;90:4933-4937
24. Seeger K, Adams HP, Buchwald D, Beyermann B, Kremens B, Niemeyer C, Ritter J, Schwabe D, Harms D, Schrappe M, Henze G. TEL-AML1 fusion transcript in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. The Berlin-Frankfurt-Munster Study Group. *Blood*. 1998;91:1716-1722
25. Seeger K, Buchwald D, Taube T, Peter A, von Stackelberg A, Schmitt G, Köchling J, Henze G. TEL-AML1 positivity in relapsed B cell precursor acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Leukemia*. 1999;13:1469-1470
26. Seeger K, Buchwald D, Peter A, Taube T, von Stackelberg A, Schmitt G, Henze G. TEL-AML1 fusion in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1999;94:374-376
27. Borkhardt A, Cazzaniga G, Viehmann S, Valsecchi MG, Ludwig WD, Burci L, Mangioni S, Schrappe M, Riehm H, Lampert F, Basso G, Masera G, Harbott J, Biondi A. Incidence and clinical relevance of TEL/AML1 fusion genes in children with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the German and Italian multicenter therapy trials. Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica and the Berlin-Frankfurt-Munster Study Group. *Blood*. 1997;90:571-577
28. Rubnitz JE, Downing JR, Pui CH, Shurtleff SA, Raimondi SC, Evans WE, Head DR, Crist WM, Rivera GK, Hancock ML, Boyett JM, Buijs A, Grosveld G, Behm FG. TEL gene rearrangement in acute lymphoblastic leukemia: a new genetic marker with prognostic significance. *J Clin Oncol*. 1997;15:1150-1157
29. Shurtleff SA, Buijs A, Behm FG, Rubnitz JE, Raimondi SC, Hancock ML, Chan GC, Pui CH, Grosveld G, Downing JR. TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia*. 1995;9:1985-1989
30. Seeger K, Stackelberg AV, Taube T, Buchwald D, Korner G, Suttorp M, Dorffel W, Tausch W, Henze G. Relapse of TEL-AML1-positive acute lymphoblastic leukemia in childhood: a matched-pair analysis. *J Clin Oncol*. 2001;19:3188-3193.
31. Beyermann B, Adams HP, Henze G. Philadelphia chromosome in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia: a matched-pair analysis. Berlin-Frankfurt-Munster Study Group. *J Clin Oncol*. 1997;15:2231-2237
32. Beyermann B, Agthe AG, Adams HP, Seeger K, Linderkamp C, Goetze G, Ludwig WD, Henze G. Clinical features and outcome of children with first marrow relapse of acute lymphoblastic leukemia expressing BCR-ABL fusion transcripts. BFM Relapse Study Group. *Blood*. 1996;87:1532-1538
33. Taube T, Seeger K, Beyermann B, Hanel C, Duda S, Linderkamp C, Henze G. Multiplex PCR for simultaneous detection of the most frequent T cell receptor-delta gene rearrangements in childhood ALL. *Leukemia*. 1997;11:1978-1982
34. Seeger K, Taube T, Eckert C, Hanel C, Pogodda M, Henze G. Unusual T-cell receptor-delta gene rearrangement patterns revealed by screening of a large series of childhood acute lymphoblastic leukaemia by multiplex polymerase chain reaction. *Br J Haematol*. 2001;113:318-322.
35. Zhu J, Emerson SG. Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene*. 2002;21:3295-3313.
36. Look AT. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science*. 1997;278:1059-1064.
37. Gilliland DG, Tallman MS. Focus on acute leukemias. *Cancer Cell*. 2002;1:417-420.

38. Ma SK, Wan TSK, Chan LC. Cytogenetics and molecular genetics of childhood leukemia. *Hematological Oncology*. 1999;17
39. Orkin SH. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet*. 2000;1:57-64.
40. Akashi K, Traver D, Kondo M, Weissman IL. Lymphoid development from hematopoietic stem cells. *Int J Hematol*. 1999;69:217-226.
41. Busslinger M, Nutt SL, Rolink AG. Lineage commitment in lymphopoiesis. *Curr Opin Immunol*. 2000;12:151-158.
42. Kondo M, Scherer DC, King AG, Manz MG, Weissman IL. Lymphocyte development from hematopoietic stem cells. *Curr Opin Genet Dev*. 2001;11:520-526.
43. Nagamura-Inoue T, Tamura T, Ozato K. Transcription factors that regulate growth and differentiation of myeloid cells. *Int Rev Immunol*. 2001;20:83-105.
44. Nutt SL, Rolink AG, Busslinger M. The molecular basis of B-cell lineage commitment. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1999;64:51-59.
45. Reya T, Grosschedl R. Transcriptional regulation of B-cell differentiation. *Curr Opin Immunol*. 1998;10:158-165.
46. Rolink AG, Schaniel C, Busslinger M, Nutt SL, Melchers F. Fidelity and infidelity in commitment to B-lymphocyte lineage development. *Immunol Rev*. 2000;175:104-111.
47. Ward AC, Loeb DM, Soede-Bobok AA, Touw IP, Friedman AD. Regulation of granulopoiesis by transcription factors and cytokine signals. *Leukemia*. 2000;14:973-990.
48. Valledor AF, Borrás FE, Culléll-Young M, Celada A. Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation. *J Leukoc Biol*. 1998;63:405-417.
49. DeKoter RP, Lee HJ, Singh H. PU.1 regulates expression of the interleukin-7 receptor in lymphoid progenitors. *Immunity*. 2002;16:297-309.
50. DeKoter RP, Walsh JC, Singh H. PU.1 regulates both cytokine-dependent proliferation and differentiation of granulocyte/macrophage progenitors. *Embo J*. 1998;17:4456-4468.
51. Bain G, Cravatt CB, Loomans C, Alberola-Ila J, Hedrick SM, Murre C. Regulation of the helix-loop-helix proteins, E2A and Id3, by the Ras-ERK MAPK cascade. *Nat Immunol*. 2001;2:165-171.
52. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. 2000;404:193-197.
53. Barreda DR, Belosevic M. Transcriptional regulation of hemopoiesis. *Dev Comp Immunol*. 2001;25:763-789.
54. Rothenberg EV, Dionne CJ. Lineage plasticity and commitment in T-cell development. *Immunol Rev*. 2002;187:96-115.
55. Schebesta M, Heavey B, Busslinger M. Transcriptional control of B-cell development. *Curr Opin Immunol*. 2002;14:216-223.
56. Cantor AB, Orkin SH. Hematopoietic development: a balancing act. *Curr Opin Genet Dev*. 2001;11:513-519.
57. Rothenberg EV, Anderson MK. Elements of transcription factor network design for T-lineage specification. *Dev Biol*. 2002;246:29-44.
58. Nutt SL, Heavey B, Rolink AG, Busslinger M. Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature*. 1999;401:556-562.
59. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*. 1997;91:661-672.
60. Scott EW, Fisher RC, Olson MC, Kehrli EW, Simon MC, Singh H. PU.1 functions in a cell-autonomous manner to control the differentiation of multipotential lymphoid-myeloid progenitors. *Immunity*. 1997;6:437-447.
61. DeKoter RP, Singh H. Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science*. 2000;288:1439-1441.
62. Nutt SL, Eberhard D, Horcher M, Rolink AG, Busslinger M. Pax5 determines the identity of B cells from the beginning to the end of B-lymphopoiesis. *Int Rev Immunol*. 2001;20:65-82.
63. Chiang MY, Monroe JG. Role for transcription Pax5A factor in maintaining commitment to the B cell lineage by selective inhibition of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor expression. *J Immunol*. 2001;166:6091-6098.
64. Horcher M, Souabni A, Busslinger M. Pax5/BSAP maintains the identity of B cells in late B lymphopoiesis. *Immunity*. 2001;14:779-790.

65. Rolink AG, Schaniel C, Melchers F. Stability and plasticity of wild-type and Pax5-deficient precursor B cells. *Immunol Rev.* 2002;187:87-95.
66. Schaniel C, Bruno L, Melchers F, Rolink AG. Multiple hematopoietic cell lineages develop in vivo from transplanted Pax5-deficient pre-B I-cell clones. *Blood.* 2002;99:472-478.
67. Peschon JJ, Morrissey PJ, Grabstein KH, Ramsdell FJ, Maraskovsky E, Gliniak BC, Park LS, Ziegler SF, Williams DE, Ware CB, et al. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med.* 1994;180:1955-1960.
68. von Freeden Jeffry U, Davidson N, Wiler R, Fort M, Burdach S, Murray R. IL-7 deficiency prevents development of a non-T cell non-B cell-mediated colitis. *J Immunol.* 1998;161:5673-5680.
69. Reya T, O'Riordan M, Okamura R, Devaney E, Willert K, Nusse R, Grosschedl R. Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. *Immunity.* 2000;13:15-24.
70. Kee BL, Bain G, Murre C. IL-7 α and E47: independent pathways required for development of multipotent lymphoid progenitors. *Embo J.* 2002;21:103-113.
71. Kee BL, Rivera RR, Murre C. Id3 inhibits B lymphocyte progenitor growth and survival in response to TGF- β . *Nat Immunol.* 2001;2:242-247.
72. Angelin-Duclos C, Cattoretti G, Lin KI, Calame K. Commitment of B lymphocytes to a plasma cell fate is associated with Blimp-1 expression in vivo. *J Immunol.* 2000;165:5462-5471.
73. Reimold AM, Iwakoshi NN, Manis J, Vallabhajosyula P, Szomolanyi-Tsuda E, Gravalles EM, Friend D, Grusby MJ, Alt F, Glimcher LH. Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature.* 2001;412:300-307.
74. Turner CA, Jr., Mack DH, Davis MM. Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell.* 1994;77:297-306.
75. Piskurich JF, Lin KI, Lin Y, Wang Y, Ting JP, Calame K. BLIMP-1 mediates extinction of major histocompatibility class II transactivator expression in plasma cells. *Nat Immunol.* 2000;1:526-532.
76. Calame KL. Plasma cells: finding new light at the end of B cell development. *Nat Immunol.* 2001;2:1103-1108.
77. Shaffer AL, Lin KI, Kuo TC, Yu X, Hurt EM, Rosenwald A, Giltane JM, Yang L, Zhao H, Calame K, Staudt LM. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity.* 2002;17:51-62.
78. Haks MC, Oosterwegel MA, Blom B, Spits HM, Kruisbeek AM. Cell-fate decisions in early T cell development: regulation by cytokine receptors and the pre-TCR. *Semin Immunol.* 1999;11:23-37.
79. Spits H, Blom B, Jaleco AC, Weijer K, Verschuren MC, van Dongen JJ, Heemskerk MH, Res PC. Early stages in the development of human T, natural killer and thymic dendritic cells. *Immunol Rev.* 1998;165:75-86.
80. Rodewald HR, Fehling HJ. Molecular and cellular events in early thymocyte development. *Adv Immunol.* 1998;69:1-112.
81. Robson MacDonald H, Wilson A, Radtke F. Notch1 and T-cell development: insights from conditional knockout mice. *Trends Immunol.* 2001;22:155-160.
82. Radtke F, Ferrero I, Wilson A, Lees R, Aguet M, MacDonald HR. Notch1 deficiency dissociates the intrathymic development of dendritic cells and T cells. *J Exp Med.* 2000;191:1085-1094.
83. Pui JC, Allman D, Xu L, DeRocco S, Karnell FG, Bakkour S, Lee JY, Kadesch T, Hardy RR, Aster JC, Pear WS. Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity.* 1999;11:299-308.
84. Wilson A, MacDonald HR, Radtke F. Notch 1-deficient common lymphoid precursors adopt a B cell fate in the thymus. *J Exp Med.* 2001;194:1003-1012.
85. Ordentlich P, Lin A, Shen CP, Blaumueller C, Matsuno K, Artavanis-Tsakonas S, Kadesch T. Notch inhibition of E47 supports the existence of a novel signaling pathway. *Mol Cell Biol.* 1998;18:2230-2239.
86. Anderson AC, Robey EA, Huang YH. Notch signaling in lymphocyte development. *Curr Opin Genet Dev.* 2001;11:554-560.
87. Allman D, Aster JC, Pear WS. Notch signaling in hematopoiesis and early lymphocyte development. *Immunol Rev.* 2002;187:75-86.
88. Altucci L, Gronemeyer H. The promise of retinoids to fight against cancer. *Nat Rev Cancer.* 2001;1:181-193.
89. Pui CH, Gaynon PS, Boyett JM, Chessells JM, Baruchel A, Kamps W, Silverman LB, Biondi A, Harms DO, Vilmer E, Schrappe M, Camitta B. Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region. *Lancet.* 2002;359:1909-1915.

90. Schrappe M, Arico M, Harbott J, Biondi A, Zimmermann M, Conter V, Reiter A, Valsecchi MG, Gadner H, Basso G, Bartram CR, Lampert F, Riehm H, Masera G. Philadelphia chromosome-positive (Ph+) childhood acute lymphoblastic leukemia: good initial steroid response allows early prediction of a favorable treatment outcome. *Blood*. 1998;92:2730-2741.
91. Pui CH. Recent advances in the biology and treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Curr Opin Hematol*. 1998;5:292-301.
92. Hahn WC, Weinberg RA. Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:331-341.
93. Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, Pieters R, den Boer ML, Minden MD, Sallan SE, Lander ES, Golub TR, Korsmeyer SJ. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet*. 2002;30:41-47.
94. Ferrando AA, Neuberg DS, Staunton J, Loh ML, Huard C, Raimondi SC, Behm FG, Pui CH, Downing JR, Gilliland DG, Lander ES, Golub TR, Look AT. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*. 2002;1:75-87.
95. Yeoh EJ, Williams K, Patel D, Shurtleff S, Behm S, Raimondi S, Relling M, Cheng C, Wilkins D, Wong LS, Evans W, Pui CH, Naeve C, Downing JR. Expression profiling of pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL) at diagnosis accurately predicts both the risk of relapse and of developing therapy-induced acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2001;98:433a.
96. Mandelli F, Diverio D, Avvisati G, Luciano A, Barbui T, Bernasconi C, Broccia G, Cerri R, Falda M, Fioritoni G, Leoni F, Liso V, Petti MC, Rodeghiero F, Saglio G, Vegna ML, Visani G, Jehn U, Willemze R, Muus P, Pelicci PG, Biondi A, Lo Coco F. Molecular remission in PML/RAR alpha-positive acute promyelocytic leukemia by combined all-trans retinoic acid and idarubicin (AIDA) therapy. Gruppo Italiano-Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto and Associazione Italiana di Ematologia ed Oncologia Pediatrica Cooperative Groups. *Blood*. 1997;90:1014-1021.
97. Calleja EM, Warrell RP, Jr. Differentiating agents in pediatric malignancies: all-trans-retinoic acid and arsenic in acute promyelocytic leukemia. *Curr Oncol Rep*. 2000;2:519-523.
98. Hu J, Shen ZX, Sun GL, Chen SJ, Wang ZY, Chen Z. Long-term survival and prognostic study in acute promyelocytic leukemia treated with all-trans-retinoic acid, chemotherapy, and As2O3: an experience of 120 patients at a single institution. *Int J Hematol*. 1999;70:248-260.
99. Chen GQ, Shi XG, Tang W, Xiong SM, Zhu J, Cai X, Han ZG, Ni JH, Shi GY, Jia PM, Liu MM, He KL, Niu C, Ma J, Zhang P, Zhang TD, Paul P, Naoe T, Kitamura K, Miller W, Waxman S, Wang ZY, de The H, Chen SJ, Chen Z. Use of arsenic trioxide (As2O3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): I. As2O3 exerts dose-dependent dual effects on APL cells. *Blood*. 1997;89:3345-3353.
100. Davison K, Mann KK, Miller WH, Jr. Arsenic trioxide: mechanisms of action. *Semin Hematol*. 2002;39:3-7.
101. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*. 1996;2:561-566.
102. O'Dwyer ME, Druker BJ. Status of bcr-abl tyrosine kinase inhibitors in chronic myelogenous leukemia. *Curr Opin Oncol*. 2000;12:594-597.
103. Thiesing JT, Ohno-Jones S, Kolibaba KS, Druker BJ. Efficacy of STI571, an abl tyrosine kinase inhibitor, in conjunction with other antileukemic agents against bcr-abl-positive cells. *Blood*. 2000;96:3195-3199.
104. Fenaux P, Chomienne C, Degos L. Acute promyelocytic leukemia: biology and treatment. *Semin Oncol*. 1997;24:92-102.
105. Marks P, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer*. 2001;1:194-202.
106. Johnstone RW. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2002;1:287-299.
107. Vigushin DM, Coombes RC. Histone deacetylase inhibitors in cancer treatment. *Anticancer Drugs*. 2002;13:1-13.
108. Minucci S, Nervi C, Lo Coco F, Pelicci PG. Histone deacetylases: a common molecular target for differentiation treatment of acute myeloid leukemias? *Oncogene*. 2001;20:3110-3115.
109. Bird AP, Wolffe AP. Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell*. 1999;99:451-454.
110. Wang J, Sauntharajah Y, Redner RL, Liu JM. Inhibitors of histone deacetylase relieve ETO-mediated repression and induce differentiation of AML1-ETO leukemia cells. *Cancer Res*. 1999;59:2766-2769.
111. Warrell RP, Jr., He LZ, Richon V, Calleja E, Pandolfi PP. Therapeutic targeting of transcription in acute promyelocytic leukemia by use of an inhibitor of histone deacetylase. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90:1621-1625.

112. Nieda M, Nicol A, Kikuchi A, Kashiwase K, Taylor K, Suzuki K, Tadokoro K, Juji T. Dendritic cells stimulate the expansion of bcr-abl specific CD8⁺ T cells with cytotoxic activity against leukemic cells from patients with chronic myeloid leukemia. *Blood*. 1998;91:977-983.
113. Pinilla-Ibarz J, Cathcart K, Korontsvit T, Soignet S, Bocchia M, Caggiano J, Lai L, Jimenez J, Kolitz J, Scheinberg DA. Vaccination of patients with chronic myelogenous leukemia with bcr-abl oncogene breakpoint fusion peptides generates specific immune responses. *Blood*. 2000;95:1781-1787.
114. Wang H, Prasad G, Buolamwini JK, Zhang R. Antisense anticancer oligonucleotide therapeutics. *Curr Cancer Drug Targets*. 2001;1:177-196.
115. McLean TW, Ringold S, Neuberg D, Stegmaier K, Tantravahi R, Ritz J, Koeffler HP, Takeuchi S, Janssen JW, Seriu T, Bartram CR, Sallan SE, Gilliland DG, Golub TR. TEL/AML-1 dimerizes and is associated with a favorable outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1996;88:4252-4258.
116. Rubnitz JE, Pui CH. Recent advances in the biology and treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Curr Opin Hematol*. 1997;4:233-241.
117. Golub TR, Barker GF, Stegmaier K, Gilliland DG. The TEL gene contributes to the pathogenesis of myeloid and lymphoid leukemias by diverse molecular genetic mechanisms. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1997;220:67-79.
118. Wang LC, Swat W, Fujiwara Y, Davidson L, Visvader J, Kuo F, Alt FW, Gilliland DG, Golub TR, Orkin SH. The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes Dev*. 1998;12:2392-2402.
119. Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell*. 1996;84:321-330.
120. Okada H, Watanabe T, Niki M, Takano H, Chiba N, Yanai N, Tani K, Hibino H, Asano S, Mucenski ML, Ito Y, Noda T, Satake M. AML1(-/-) embryos do not express certain hematopoiesis-related gene transcripts including those of the PU.1 gene. *Oncogene*. 1998;17:2287-2293.
121. Kwiatkowski BA, Bastian LS, Bauer TR, Jr., Tsai S, Zielinska Kwiatkowska AG, Hickstein DD. The ets family member Tel binds to the Fli-1 oncoprotein and inhibits its transcriptional activity. *J Biol Chem*. 1998;273:17525-17530.
122. Fenrick R, Wang L, Nip J, Amann JM, Rooney RJ, Walker-Daniels J, Crawford HC, Hulboy DL, Kinch MS, Matrisian LM, Hiebert SW. TEL, a putative tumor suppressor, modulates cell growth and cell morphology of ras-transformed cells while repressing the transcription of stromelysin-1. *Mol Cell Biol*. 2000;20:5828-5839.
123. Guidez F, Petrie K, Ford AM, Lu H, Bennett CA, MacGregor A, Hannemann J, Ito Y, Ghysdael J, Greaves M, Wiedemann LM, Zelent A. Recruitment of the nuclear receptor corepressor N-CoR by the TEL moiety of the childhood leukemia-associated TEL-AML1 oncoprotein. *Blood*. 2000;96:2557-2561.
124. Hiebert SW, Lutterbach B, Durst K, Wang L, Linggi B, Wu S, Wood L, Amann J, King D, Hou Y. Mechanisms of transcriptional repression by the t(8;21)-, t(12;21)-, and inv(16)-encoded fusion proteins. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2001;48:S31-34.
125. Wang L, Hiebert SW. TEL contacts multiple co-repressors and specifically associates with histone deacetylase-3. *Oncogene*. 2001;20:3716-3725.
126. Murphy M, Ahn J, Walker KK, Hoffman WH, Evans RM, Levine AJ, George DL. Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev*. 1999;13:2490-2501.
127. Zilfou JT, Hoffman WH, Sank M, George DL, Murphy M. The corepressor mSin3a interacts with the proline-rich domain of p53 and protects p53 from proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol*. 2001;21:3974-3985.
128. Sherr C, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*. 2002;2:103.
129. Wang Q, Stacy T, Binder M, Marin Padilla M, Sharpe AH, Speck NA. Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:3444-3449.
130. Frank R, Zhang J, Uchida H, Meyers S, Hiebert SW, Nimer SD. The AML1/ETO fusion protein blocks transactivation of the GM-CSF promoter by AML1B. *Oncogene*. 1995;11:2667-2674.
131. Hiebert S, Sun W, Davis J, Golub T, Shurtleff S, Buijs A, Downing J, Grosveld G, Roussell M, Gilliland D, Lenny N, Meyers S. The t(12;21) translocation converts AML-1B from an activator to a repressor of transcription. *Molecular and cellular biology*. 1996;16:1349-1355.
132. Meyers S, Lenny N, Hiebert S. The t(8;21) fusion protein interferes with AML-1B-dependent transcriptional activation. *Mol Cell Biol*. 1995;15:1974-1982.
133. Miyoshi H, Ohira M, Shimizu K, Mitani K, Hirai H, Imai T, Yokoyama K, Soeda E, Ohki M. Alternative splicing and genomic structure of the AML1 gene involved in acute myeloid leukemia. *Nucleic Acids Res*. 1995;23:2762-2769.

134. Tanaka T, Tanaka K, Ogawa S, Kurokawa M, Mitani K, Nishida J, Shibata Y, Yazaki Y, Hirai H. An acute myeloid leukemia gene, AML1, regulates hemopoietic myeloid cell differentiation and transcriptional activation antagonistically by two alternative spliced forms. *EMBO J*. 1995;14:341-350
135. Tanaka K, Tanaka T, Ogawa S, Kurokawa M, Mitani K, Yazaki Y, Hirai H. Increased expression of AML1 during retinoic-acid-induced differentiation of U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;211:1023-1030
136. Miyoshi H, Shimizu K, Kozu T, Maseki N, Kaneko Y, Ohki M. The t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:10431-10434
137. Rubnitz JE, Shuster JJ, Land VJ, Link MP, Pullen DJ, Camitta BM, Pui CH, Downing JR, Behm FG. Case-control study suggests a favorable impact of TEL rearrangement in patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia treated with antimetabolite-based therapy: a Pediatric Oncology Group study. *Blood*. 1997;89:1143-1146
138. Berger R, Le Coniat M, Romana SP, Jonveaux P. Secondary acute myeloblastic leukemia with t(16;21) (q24;q22). involving the AML1 gene. *Hematol Cell Ther*. 1996;38:183-186
139. Stanulla M, Wang J, Chervinsky DS, Aplan PD. Topoisomerase II inhibitors induce DNA double-strand breaks at a specific site within the AML1 locus. *Leukemia*. 1997;11:490-496
140. Nucifora G, Rowley JD. The AML1 gene in the 8;21 and 3;21 translocations in chronic and acute myeloid leukemia. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1994;59:595-605
141. Fears S, Gavin M, Zhang DE, Hetherington C, Ben David Y, Rowley JD, Nucifora G. Functional characterization of ETV6 and ETV6/CBFA2 in the regulation of the MCSFR proximal promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:1949-1954
142. Hiebert SW, Lutterbach B, Amann J. Role of co-repressors in transcriptional repression mediated by the t(8;21), t(16;21), t(12;21), and inv(16) fusion proteins. *Curr Opin Hematol*. 2001;8:197-200.
143. Jousset C, Carron C, Boureux A, Quang CT, Oury C, Dusanter Fourt I, Charon M, Levin J, Bernard O, Ghysdael J. A domain of TEL conserved in a subset of ETS proteins defines a specific oligomerization interface essential to the mitogenic properties of the TEL-PDGFR beta oncoprotein. *EMBO J*. 1997;16:69-82
144. Lacronique V, Boureux A, Valle VD, Poirel H, Quang CT, Mauchauffe M, Berthou C, Lessard M, Berger R, Ghysdael J, Bernard OA. A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science*. 1997;278:1309-1312
145. Peeters P, Wlodarska I, Baens M, Criel A, Selleslag D, Hagemeijer A, Van den Berghe H, Marynen P. Fusion of ETV6 to MDS1/EVI1 as a result of t(3;12)(q26;p13) in myeloproliferative disorders. *Cancer Res*. 1997;57:564-569
146. Schwaller J, Frantsve J, Aster J, Williams IR, Tomasson MH, Ross TS, Peeters P, Van Rompaey L, Van Etten RA, Ilaria R, Jr., Marynen P, Gilliland DG. Transformation of hematopoietic cell lines to growth-factor independence and induction of a fatal myelo- and lymphoproliferative disease in mice by retrovirally transduced TEL/JAK2 fusion genes. *EMBO J*. 1998;17:5321-5333
147. Chakrabarti SR, Sood R, Nandi S, Nucifora G. Posttranslational modification of TEL and TEL/AML1 by SUMO-1 and cell-cycle-dependent assembly into nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:13281-13285.
148. Uchida H, Downing JR, Miyazaki Y, Frank R, Zhang J, Nimer SD. Three distinct domains in TEL-AML1 are required for transcriptional repression of the IL-3 promoter. *Oncogene*. 1999;18:1015-1022
149. Chakrabarti SR, Sood R, Ganguly S, Bohlander S, Shen Z, Nucifora G. Modulation of TEL transcription activity by interaction with the ubiquitin-conjugating enzyme UBC9. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:7467-7472
150. Chakrabarti SR, Nucifora G. The leukemia-associated gene TEL encodes a transcription repressor which associates with SMRT and mSin3A. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;264:871-877.
151. Fenrick R, Amann JM, Lutterbach B, Wang L, Westendorf JJ, Downing JR, Hiebert SW. Both TEL and AML-1 contribute repression domains to the t(12;21) fusion protein. *Mol Cell Biol*. 1999;19:6566-6574.
152. Speck NA. Core binding factor and its role in normal hematopoietic development. *Curr Opin Hematol*. 2001;8:192-196.
153. Bernardin F, Yang Y, Cleaves R, Zahurak M, Cheng L, Civin CI, Friedman AD. TEL-AML1, Expressed from t(12;21) in Human Acute Lymphocytic Leukemia, Induces Acute Leukemia in Mice. *Cancer Res*. 2002;62:3904-3908.
154. Takeuchi S, Bartram CR, Seriu T, Miller CW, Tobler A, Janssen JW, Reiter A, Ludwig WD, Zimmermann M, Schwaller J, et al. Analysis of a family of cyclin-dependent kinase inhibitors: p15/MTS2/INK4B, p16/MTS1/INK4A, and p18 genes in acute lymphoblastic leukemia of childhood. *Blood*. 1995;86:755-760.
155. Graf Einsiedel H, Taube T, Hartmann R, Eckert C, Seifert G, Wellmann S, Henze G, Seeger K. Prognostic value of p16(INK4a) gene deletions in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2001;97:4002-4004.

156. Hotfilder M, Rottgers S, Rosemann A, Jurgens H, Harbott J, Vormoor J. Immature CD34(+)CD19(-) progenitor/stem cells in TEL/AML1-positive acute lymphoblastic leukemia are genetically and functionally normal. *Blood*. 2002;100:640-646.
157. Armstrong SA, Hsieh JJ, Korsmeyer SJ. Genomic approaches to the pathogenesis and treatment of acute lymphoblastic leukemias. *Curr Opin Hematol*. 2002;9:339-344.
158. Golub T. Genomic approaches to the pathogenesis of hematologic malignancy. *Curr Opin Hematol*. 2001;8:252-261
159. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*. 1999;286:531-537.
160. Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA, Williams WK, Patel D, Mahfouz R, Behm FG, Raimondi SC, Relling MV, Patel A, Cheng C, Campana D, Wilkins D, Zhou X, Li J, Liu H, Pui CH, Evans WE, Naeve C, Wong L, Downing JR. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell*. 2002;1:133-143.
161. Romana SP, Mauchauffe M, Le Coniat M, Chumakov I, Le Paslier D, Berger R, Bernard OA. The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a tel-AML1 gene fusion. *Blood*. 1995;85:3662-3670
162. Nakao M, Yokota S, Horiike S, Taniwaki M, Kashima K, Sonoda Y, Koizumi S, Takaue Y, Matsushita T, Fujimoto T, Misawa S. Detection and quantification of TEL/AML1 fusion transcripts by polymerase chain reaction in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 1996;10:1463-1470
163. Rubnitz JE, Behm FG, Wichlan D, Ryan C, Sandlund JT, Ribeiro RC, Rivera GK, Hancock ML, Relling MV, Evans WE, Pui CH, Downing JR. Low frequency of TEL-AML1 in relapsed acute lymphoblastic leukemia supports a favorable prognosis for this genetic subgroup. *Leukemia*. 1999;13:19-21
164. Zuna J, Hrusak O, Kalinova M, Muzikova K, Sary J, Trka J. Significantly lower relapse rate for TEL/AML1-positive ALL. *Leukemia*. 1999;13:1633
165. Loh ML, Silverman LB, Young ML, Neuberg D, Golub TR, Sallan SE, Gilliland DG. Incidence of TEL/AML1 fusion in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1998;92:4792-4797
166. Lanza C, Volpe G, Basso G, Gottardi E, Barisone E, Spinelli M, Ricotti E, Cilli V, Perfetto F, Madon E, Saglio G. Outcome and lineage involvement in t(12;21) childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 1997;97:460-462.
167. Takahashi Y, Horibe K, Kiyoi H, Miyashita Y, Fukuda M, Mori H, Nozaki C, Hasegawa S, Kawabe T, Kato K, Kojima S, Matuyama T, Naoe T. Prognostic significance of TEL/AML1 fusion transcript in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 1998;20:190-195
168. Ayigad S, Kuperstein G, Zilberstein J, Liberzon E, Stark B, Gelernter I, Kodman Y, Luria D, Ash S, Stein J, Goshen Y, Yaniv I, Cohen IJ, Zaizov R. TEL-AML1 fusion transcript designates a favorable outcome with an intensified protocol in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 1999;13:481-483
169. Jamil A, Theil KS, Kahwash S, Ruymann FB, Klopfenstein KJ. TEL/AML-1 fusion gene. its frequency and prognostic significance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2000;122:73-78.
170. Hann I, Vora A, Harrison G, Martineau M, Moorman AV, Secker Walker LM, Eden O, Hill F, Gibson B, Richards S. Determinants of outcome after intensified therapy of childhood lymphoblastic leukaemia: results from Medical Research Council United Kingdom acute lymphoblastic leukaemia XI protocol. *Br J Haematol*. 2001;113:103-114.
171. Hubeek I, Ramakers-van Woerden NL, Pieters R, Slater R, Beverloo HB, van Wering ER, Kamps W, Hahlen K, Veerman AJ. TEL/AML1 fusion is not a prognostic factor in Dutch childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2001;113:254-255.
172. Tsang KS, Li CK, Chik KW, Shing MM, Tsoi WC, Ng MH, Lau TT, Leung Y, Yuen PM. TEL/AML1 rearrangement and the prognostic significance in childhood acute lymphoblastic leukemia in Hong Kong. *Am J Hematol*. 2001;68:91-98.
173. Uckun FM, Pallisgaard N, Hokland P, Navara C, Narla R, Gaynon PS, Sather H, Heerema N. Expression of TEL-AML1 fusion transcripts and response to induction therapy in standard risk acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2001;42:41-56.
174. Zuna J, Hrusak O, Kalinova M, Muzikova K, Sary J, Trka J. TEL/AML1 positivity in childhood ALL: average or better prognosis? Czech Paediatric Haematology Working Group. *Leukemia*. 1999;13:22-24
175. Ramakers-van Woerden NL, Pieters R, Loonen AH, Hubeek I, van Drunen E, Beverloo HB, Slater RM, Harbott J, Seyfarth J, van Wering ER, Hahlen K, Schmiegelow K, Janka-Schaub GE, Veerman AJ. TEL/AML1 gene fusion is related to in vitro drug sensitivity for L-asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2000;96:1094-1099.

176. Whitehead VM, Payment C, Cooley L, Lauer SJ, Mahoney DH, Shuster JJ, Vuchich MJ, Bernstein ML, Look AT, Pullen DJ, Camitta B. The association of the TEL-AML1 chromosomal translocation with the accumulation of methotrexate polyglutamates in lymphoblasts and with ploidy in childhood B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *Leukemia*. 2001;15:1081-1088.
177. Wiemels JL, Smith RN, Taylor GM, Eden OB, Alexander FE, Greaves MF. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:4004-4009.
178. Seeger K, Kreuzer KA, Lass U, Taube T, Buchwald D, Eckert C, Korner G, Schmidt CA, Henze G. Molecular quantification of response to therapy and remission status in TEL-AML1-positive childhood ALL by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Cancer Res*. 2001;61:2517-2522.
179. Bolufer P, Barragan E, Verdeguer A, Cervera J, Fernandez JM, Moreno I, Lerma E, Esquembre C, Tasso M, Fuster V, Bermudez M, Sanz MA. Rapid quantitative detection of TEL-AML1 fusion transcripts in pediatric acute lymphoblastic leukemia by real-time reverse transcription polymerase chain reaction using fluorescently labeled probes. *Haematologica*. 2002;87:23-32.
180. Schlieben S, Borkhardt A, Reinisch I, Ritterbach J, Janssen JW, Ratei R, Schrappe M, Repp R, Zimmermann M, Kabisch H, Janka-Schaub G, Bartram CR, Ludwig WD, Riehm H, Lampert F, Harbott J. Incidence and clinical outcome of children with BCR/ABL-positive acute lymphoblastic leukemia (ALL). A prospective RT-PCR study based on 673 patients enrolled in the German pediatric multicenter therapy trials ALL-BFM-90 and CoALL-05-92. *Leukemia*. 1996;10:957-963.
181. Arico M, Valsecchi MG, Camitta B, Schrappe M, Chessells J, Baruchel A, Gaynon P, Silverman L, Janka-Schaub G, Kamps W, Pui CH, Masera G. Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2000;342:998-1006.
182. Burmeister T, Maurer J, Aivado M, Elmaagacli AH, Grunebach F, Held KR, Hess G, Hochhaus A, Hoppner W, Lentz KU, Lubbert M, Schafer KL, Schafhausen P, Schmidt CA, Schuler F, Seeger K, Seelig R, Thiede C, Viehmann S, Weber C, Wilhelm S, Christmann A, Clement JH, Ebener U, Enczmann J, Leo R, Schleuning M, Schoch R, Thiel E. Quality assurance in RT-PCR-based BCR/ABL diagnostics--results of an interlaboratory test and a standardization approach. *Leukemia*. 2000;14:1850-1856.
183. Sawyers CL. Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1999;340:1330-1340.
184. Turhan AG, Solary E, Vainchenker W, Dusanter-Fourt I. Molecular pathophysiology of chronic myelogenous leukemia. *Hematol Cell Ther*. 1998;40:217-221.
185. Sawyers CL, Hochhaus A, Feldman E, Goldman JM, Miller CB, Ottmann OG, Schiffer CA, Talpaz M, Guilhot F, Deininger MW, Fischer T, O'Brien SG, Stone RM, Gambacorti-Passerini CB, Russell NH, Reiffers JJ, Shea TC, Chapuis B, Coutre S, Tura S, Morra E, Larson RA, Saven A, Peschel C, Gratwohl A, Mandelli F, Ben-Am M, Gathmann I, Capdeville R, Paquette RL, Druker BJ. Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood*. 2002;99:3530-3539.
186. Talpaz M, Silver RT, Druker BJ, Goldman JM, Gambacorti-Passerini C, Guilhot F, Schiffer CA, Fischer T, Deininger MW, Lennard AL, Hochhaus A, Ottmann OG, Gratwohl A, Baccarani M, Stone R, Tura S, Mahon FX, Fernandes-Reese S, Gathmann I, Capdeville R, Kantarjian HM, Sawyers CL. Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. *Blood*. 2002;99:1928-1937.
187. Shah N, Nicoll J, Nagar B, Gorre M, Paquette R, Kuriyan J, Sawyers C. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2002;2:117.
188. Knechtli CJ, Goulden NJ, Hancock JP, Grandage VL, Harris EL, Garland RJ, Jones CG, Rowbottom AW, Hunt LP, Green AF, Clarke E, Lankester AW, Cornish JM, Pamphilon DH, Steward CG, Oakhill A. Minimal residual disease status before allogeneic bone marrow transplantation is an important determinant of successful outcome for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1998;92:4072-4079.
189. Knechtli CJ, Goulden NJ, Hancock JP, Harris EL, Garland RJ, Jones CG, Grandage VL, Rowbottom AW, Green AF, Clarke E, Lankester AW, Potter MN, Cornish JM, Pamphilon DH, Steward CG, Oakhill A. Minimal residual disease status as a predictor of relapse after allogeneic bone marrow transplantation for children with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 1998;102:860-871.
190. Campana D, Coustan-Smith E. Advances in the immunological monitoring of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2002;15:1-19.
191. Campana D, Coustan Smith E. The use of flow cytometry to detect minimal residual disease in acute leukemia. *Eur J Histochem*. 1996;40 Suppl 1:39-42.

192. van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, Gottardi E, Rambaldi A, Dotti G, Griesinger F, Parreira A, Gameiro P, Diaz MG, Malec M, Langerak AW, San Miguel JF, Biondi A. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*. 1999;13:1901-1928
193. Pongers Willemse MJ, Seriu T, Stolz F, d'Aniello E, Gameiro P, Pisa P, Gonzalez M, Bartram CR, Panzer Grumayer ER, Biondi A, San Miguel JF, van Dongen JJ. Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets: report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*. 1999;13:110-118
194. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Razzouk BI, Ribeiro RC, Rivera GK, Rubnitz JE, Sandlund JT, Pui CH, Campana D. Use of peripheral blood instead of bone marrow to monitor residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2002;100:2399-2402.
195. Goulden NJ, Knechtli CJ, Garland RJ, Langlands K, Hancock JP, Potter MN, Steward CG, Oakhill A. Minimal residual disease analysis for the prediction of relapse in children with standard-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 1998;100:235-244
196. Kreuzer KA, Lass U, Bohn A, Landt O, Schmidt CA. LightCycler technology for the quantitation of bcr/abl fusion transcripts. *Cancer Res*. 1999;59:3171-3174.
197. Preudhomme C, Revillion F, Merlat A, Hornez L, Roumier C, Duflos Grardel N, Jouet JP, Cosson A, Peyrat JP, Fenaux P. Detection of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia (CML) using a 'real time' quantitative RT-PCR assay. *Leukemia*. 1999;13:957-964
198. Pongers Willemse MJ, Verhagen OJ, Tibbe GJ, Wijkhuijs AJ, de Haas V, Roovers E, van der Schoot CE, van Dongen JJ. Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. *Leukemia*. 1998;12:2006-2014
199. Kreuzer K, Lass U, Bohn A, Landt O, Schmidt C. LightCycler Technology for the quantification of bcr/abl fusion transcripts. *Cancer Research*. 1999;59:3171-3174
200. Eckert C, Landt O, Taube T, Seeger K, Beyermann B, Proba J, Henze G. Potential of LightCycler Technology for quantification of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 1999;in press
201. Cayuela JM, Baruchel A, Orange C, Madani A, Auclerc MF, Daniel MT, Schaison G, Sigaux F. TEL-AML1 fusion RNA as a new target to detect minimal residual disease in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1996;88:302-308
202. Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, et al. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science*. 1995;268:1749-1753.
203. Stewart GS, Maser RS, Stankovic T, Bressan DA, Kaplan MI, Jaspers NG, Raams A, Byrd PJ, Petrini JH, Taylor AM. The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell*. 1999;99:577-587.
204. Varon R, Vissinga C, Platzer M, Cerosaletti KM, Chrzanowska KH, Saar K, Beckmann G, Seemanova E, Cooper PR, Nowak NJ, Stumm M, Weemaes CM, Gatti RA, Wilson RK, Digweed M, Rosenthal A, Sperling K, Concannon P, Reis A. Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell*. 1998;93:467-476.
205. Carney JP, Maser RS, Olivares H, Davis EM, Le Beau M, Yates JR, 3rd, Hays L, Morgan WF, Petrini JH. The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell*. 1998;93:477-486.
206. Xu Y, Ashley T, Brainerd EE, Bronson RT, Meyn MS, Baltimore D. Targeted disruption of ATM leads to growth retardation, chromosomal fragmentation during meiosis, immune defects, and thymic lymphoma. *Genes Dev*. 1996;10:2411-2422.
207. Gatei M, Young D, Cerosaletti KM, Desai-Mehta A, Spring K, Kozlov S, Lavin MF, Gatti RA, Concannon P, Khanna K. ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure. *Nat Genet*. 2000;25:115-119.
208. Lim DS, Kim ST, Xu B, Maser RS, Lin J, Petrini JH, Kastan MB. ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature*. 2000;404:613-617.
209. Shiloh Y. Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart. *Annu Rev Genet*. 1997;31:635-662.
210. Meyn MS. Ataxia-telangiectasia, cancer and the pathobiology of the ATM gene. *Clin Genet*. 1999;55:289-304.
211. Carney JP. Chromosomal breakage syndromes. *Curr Opin Immunol*. 1999;11:443-447.

212. Vanasse GJ, Concannon P, Willerford DM. Regulated Genomic Instability and Neoplasia in the Lymphoid Lineage. *Blood*. 1999;94:3997-4010
213. Kang J, Bronson RT, Xu Y. Targeted disruption of NBS1 reveals its roles in mouse development and DNA repair. *Embo J*. 2002;21:1447-1455.
214. Barlow C, Hirotsume S, Paylor R, Liyanage M, Eckhaus M, Collins F, Shiloh Y, Crawley JN, Ried T, Tagle D, Wynshaw-Boris A. Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell*. 1996;86:159-171.
215. Stilgenbauer S, Schaffner C, Litterst A, Liebisch P, Gilad S, Bar-Shira A, James MR, Lichter P, Dohner H. Biallelic mutations in the ATM gene in T-prolymphocytic leukemia. *Nat Med*. 1997;3:1155-1159.
216. Vorechovsky I, Rasio D, Luo L, Monaco C, Hammarstrom L, Webster AD, Zaloudik J, Barbanti-Brodani G, James M, Russo G, et al. The ATM gene and susceptibility to breast cancer: analysis of 38 breast tumors reveals no evidence for mutation. *Cancer Res*. 1996;56:2726-2732.
217. Vorechovsky I, Luo L, Dyer MJ, Catovsky D, Amlot PL, Yaxley JC, Foroni L, Hammarstrom L, Webster AD, Yuille MA. Clustering of missense mutations in the ataxia-telangiectasia gene in a sporadic T-cell leukaemia. *Nat Genet*. 1997;17:96-99.
218. Schaffner C, Stilgenbauer S, Rappold GA, Dohner H, Lichter P. Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94:748-753.
219. Varon R, Reis A, Henze G, von Einsiedel HG, Sperling K, Seeger K. Mutations in the Nijmegen Breakage Syndrome gene (NBS1) in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Cancer Res*. 2001;61:3570-3572.
220. Carlomagno F, Chang-Claude J, Dunning AM, Ponder BA. Determination of the frequency of the common 657Del5 Nijmegen breakage syndrome mutation in the German population: no association with risk of breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 1999;25:393-395.
221. Stumm M, von Ruskowsky A, Siebert R, Harder S, Varon R, Wieacker P, Schlegelberger B. No evidence for deletions of the NBS1 gene in lymphomas. *Cancer Genet Cytogenet*. 2001;126:60-62.
222. Stanulla M, Stumm M, Dieckvoss BO, Seidemann K, Schemmel V, Muller Brechlin A, Schrappe M, Welte K, Reiter A. No evidence for a major role of heterozygous deletion 657del5 within the NBS1 gene in the pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma of childhood and adolescence. *Br J Haematol*. 2000;109:117-120.
223. Hofmann K, Bucher P. The FHA domain: a putative nuclear signalling domain found in protein kinases and transcription factors. *Trends Biochem Sci*. 1995;20:347-349
224. Bork P, Hofmann K, Bucher P, Neuwald A, Altschul S, Koonin E. A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *FASEB J*. 1997;11:68-76
225. Concannon P, Gatti R. Diversity of ATM gene mutations detected in patients with ataxia-telangiectasia. *Hum Mutat*. 1997;10:100-107
226. Stankovic T, Weber P, Stewart G, Bedenham T, Murray J, Byrd P, Moss P, Taylor A. Inactivation of ataxia telangiectasia mutated gene in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 1999;353:26-29
227. Izatt L, Greenman J, Hodgson S, Ellis D, Watts S, Scott G, Jacobs C, Liebmann R, Zvelebil M, Mathew C, Solomon E. Identification of germline missense mutations and rare allelic variants in the ATM gene in early-onset breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 1999;26:286-294
228. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitian SV, Stockert E, Day RS, 3rd, Johnson BE, Skolnick MH. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*. 1994;264:436-440.
229. Lukas J, Parry D, Aagaard L, Mann DJ, Bartkova J, Strauss M, Peters G, Bartek J. Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature*. 1995;375:503-506.
230. Hannon GJ, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature*. 1994;371:257-261.
231. Guan KL, Jenkins CW, Li Y, Nichols MA, Wu X, O'Keefe CL, Matera AG, Xiong Y. Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev*. 1994;8:2939-2952.
232. Hirai H, Roussel MF, Kato JY, Ashmun RA, Sherr CJ. Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol*. 1995;15:2672-2681.
233. Tonini T, Hillson C, Claudio PP. Interview with the retinoblastoma family members: do they help each other? *J Cell Physiol*. 2002;192:138-150.
234. Harbour JW, Dean DC. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev*. 2000;14:2393-2409.

235. Ogawa H, Ishiguro K, Gaubatz S, Livingston DM, Nakatani Y. A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science*. 2002;296:1132-1136.
236. Rayman JB, Takahashi Y, Indjeian VB, Dannenberg JH, Catchpole S, Watson RJ, te Riele H, Dynlacht BD. E2F mediates cell cycle-dependent transcriptional repression in vivo by recruitment of an HDAC1/mSin3B corepressor complex. *Genes Dev*. 2002;16:933-947.
237. Takahashi Y, Rayman JB, Dynlacht BD. Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression. *Genes Dev*. 2000;14:804-816.
238. King RW, Jackson PK, Kirschner MW. Mitosis in transition. *Cell*. 1994;79:563-571.
239. Galaktionov K, Jessus C, Beach D. Raf1 interaction with Cdc25 phosphatase ties mitogenic signal transduction to cell cycle activation. *Genes Dev*. 1995;9:1046-1058.
240. Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1602:73-87.
241. Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature*. 1994;368:753-756.
242. Stone S, Jiang P, Dayananth P, Tavtigian SV, Katcher H, Parry D, Peters G, Kamb A. Complex structure and regulation of the P16 (MTS1) locus. *Cancer Res*. 1995;55:2988-2994.
243. Larsen CJ. Contribution of the dual coding capacity of the p16INK4a/MTS1/CDKN2 locus to human malignancies. *Prog Cell Cycle Res*. 1997;3:109-124.
244. Tao W, Levine AJ. P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:6937-6941.
245. Sharpless NE, Bardeesy N, Lee KH, Carrasco D, Castrillon DH, Aguirre AJ, Wu EA, Horner JW, DePinho RA. Loss of p16Ink4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis. *Nature*. 2001;413:86-91.
246. Carter TL, Watt PM, Kumar R, Burton PR, Reaman GH, Sather HN, Baker DL, Kees UR. Hemizygous p16(INK4A) deletion in pediatric acute lymphoblastic leukemia predicts independent risk of relapse. *Blood*. 2001;97:572-574.
247. Heyman M, Rasool O, Brandt LB, Liu Y, Grander D, Einhorn S, Soderhall S. Exclusive p15INK4B gene deletions in acute lymphocytic leukemia include the E1 beta exon of the p16INK4 gene. *Blood*. 1996;87:1657-1658.
248. Kees UR, Burton PR, Lu C, Baker DL. Homozygous deletion of the p16/MTS1 gene in pediatric acute lymphoblastic leukemia is associated with unfavorable clinical outcome. *Blood*. 1997;89:4161-4166.
249. Okuda T, Shurtleff SA, Valentine MB, Raimondi SC, Head DR, Behm F, Curcio-Brint AM, Liu Q, Pui CH, Sherr CJ, et al. Frequent deletion of p16INK4a/MTS1 and p15INK4b/MTS2 in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1995;85:2321-2330.
250. Rubnitz JE, Behm FG, Pui CH, Evans WE, Relling MV, Raimondi SC, Harrison PL, Sandlund JT, Ribeiro RC, Grosveld G, Downing JR. Genetic studies of childhood acute lymphoblastic leukemia with emphasis on p16, MLL, and ETV6 gene abnormalities: results of St Jude Total Therapy Study XII. *Leukemia*. 1997;11:1201-1206.
251. Issa JP, Zehnbauser BA, Kaufmann SH, Biel MA, Baylin SB. HIC1 hypermethylation is a late event in hematopoietic neoplasms. *Cancer Res*. 1997;57:1678-1681.
252. Barlow DP. Gametic imprinting in mammals. *Science*. 1995;270:1610-1613.
253. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet*. 1999;21:163-167.
254. Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med*. 1995;1:686-692.
255. Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, Sidransky D, Baylin SB. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res*. 1995;55:4525-4530.
256. Herman JG, Jen J, Merlo A, Baylin SB. Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15INK4B. *Cancer Res*. 1996;56:722-727.
257. Herman JG, Civin CI, Issa JP, Collector MI, Sharkis SJ, Baylin SB. Distinct patterns of inactivation of p15INK4B and p16INK4A characterize the major types of hematological malignancies. *Cancer Res*. 1997;57:837-841.
258. Wolfel T, Hauer M, Schneider J, Serrano M, Wolfel C, Klehmann-Hieb E, De Plaen E, Hankeln T, Meyer zum Buschenfelde KH, Beach D. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science*. 1995;269:1281-1284.

259. ALL-REZ. BFM 90/96: Multizentrische kooperative Studien zur Behandlung von Kindern mit Rezidiv einer akuten lymphoblastischen Leukämie. Studienleitung: Prof. Dr. Dr. h.c. G. Henze, Charité Campus Vrichow Klinikum, HU zu Berlin, Berlin, Deutschland.
260. Maloney KW, McGavran L, Odom LF, Hunger SP. Acquisition of p16(INK4A) and p15(INK4B) gene abnormalities between initial diagnosis and relapse in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1999;93:2380-2385.
261. von Einsiedel HG, Taube T, Hartmann R, Wellmann S, Seifert G, Henze G, Seeger K. Deletion analysis of p16(INKa) and p15(INKb) in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2002;99:4629-4631.
262. Wong IH, Ng MH, Huang DP, Lee JC. Aberrant p15 promoter methylation in adult and childhood acute leukemias of nearly all morphologic subtypes: potential prognostic implications. *Blood*. 2000;95:1942-1949.
263. von Einsiedel HG, Taube T, Hartmann R, Eckert C, Seifert G, Wellmann S, Henze G, Seeger K. Prognostic value of p16(INK4a) gene deletions in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2001;97:4002-4004.
264. Zuo L, Weger J, Yang Q, Goldstein AM, Tucker MA, Walker GJ, Hayward N, Dracopoli NC. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet*. 1996;12:97-99.
265. von Einsiedel HG, Taube T, Beyermann B, Dragon S, Moricke A, Kebelmann-Betz C, Kochling J, Henze G, Seeger K. Absence of mutations in the CDKN2 binding site of CDK4 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2001;40:413-417.
266. Weiss L, Sakai H. The hematopoietic stroma. *Am J Anat*. 1984;170:447-463
267. Gonda TJ, D'Andrea RJ. Activating mutations in cytokine receptors: implications for receptor function and role in disease. *Blood*. 1997;89:355-369
268. Piao X, Curtis JE, Minkin S, Minden MD, Bernstein A. Expression of the Kit and KitA receptor isoforms in human acute myelogenous leukemia. *Blood*. 1994;83:476-481
269. Heaney ML, Golde DW. Soluble cytokine receptors. *Blood*. 1996;87:847-857
270. Hershey GK, Friedrich MF, Esswein LA, Thomas ML, Chatila TA. The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor *N Engl J Med*. 1997;337:1720-1725
271. Gilliland DG, Griffin JD. Role of FLT3 in leukemia. *Curr Opin Hematol*. 2002;9:274-281.
272. Lotem J, Sachs L. Cytokine control of developmental programs in normal hematopoiesis and leukemia. *Oncogene*. 2002;21:3284-3294.
273. Arai KI, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N, Yokota T. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses and hemopoiesis by hemopoietic growth factors. *Annu Rev Biochem*. 1990;59:783-836.
274. Neidhart JA. Hematopoietic cytokines. Current use in cancer therapy. *Cancer*. 1993;72:3381-3386.
275. Badolato R, Ponzi AN, Millesimo M, Notarangelo LD, Musso T. Interleukin-15 (IL-15) induces IL-8 and monocyte chemotactic protein 1 production in human monocytes. *Blood*. 1997;90:2804-2809
276. Estaquier J, Ameisen JC. A role for T-helper type-1 and type-2 cytokines in the regulation of human monocyte apoptosis. *Blood*. 1997;90:1618-1625
277. Kebelmann-Betz C, Korner G, Badiali L, Buchwald D, Moricke A, Korte A, Kochling J, Wu S, Kappelmeier D, Oettel K, Henze G, Seeger K. Characterization of cytokine, growth factor receptor, costimulatory and adhesion molecule expression patterns of bone marrow blasts in relapsed childhood B cell precursor all. *Cytokine*. 2001;13:39-50.
278. Pistoia V. Production of cytokines by human B cells in health and disease. *Immunol Today*. 1997;18:343-350
279. Trentin L, Cerutti A, Zambello R, Sancretta R, Tassinari C. Interleukin-15 promotes the growth of leukemic cells of patients with B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Blood*. 1996;87:3327-3335
280. Trentin L, Agostini C, Facco M, Piazza F, Perin A, Siviero M, Gurrieri C, Galvan S, Adami F, Zambello R, Semenzato G. The chemokine receptor CXCR3 is expressed on malignant B cells and mediates chemotaxis. *J Clin Invest*. 1999;104:115-121
281. Fehniger TA, Suzuki K, VanDeusen JB, Cooper MA, Freud AG, Caligiuri MA. Fatal leukemia in interleukin-15 transgenic mice. *Blood Cells Mol Dis*. 2001;27:223-230.
282. Saeland S, Moreau I, Duvert V, Pandrau D, Bancherau J. In vitro growth and maturation of human B-cell precursors. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1992;182:85-94
283. Fortunel NO, Hatzfeld A, Hatzfeld JA. Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood*. 2000;96:2022-2036

284. Kehrl JH, Roberts AB, Wakefield LM, Jakowlew S, Sporn MB, Fauci. Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *J Immunol.* 1986;137:3855-3860
285. Robledo MM, Teixeira J. TGF-beta1-binding proteins on human bone marrow stromal cells. *Leuk Lymphoma.* 1997;27:509-515
286. Lagneaux L, Delforge A, Bernier M, Stryckmans P, Bron D. TGF-beta activity and expression of its receptors in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 1998;31:99-106
287. Lagneaux L, Delforge A, Snoeck R, Bosmans E, Moreau JF, Taupin JL, De Clercq E, Stryckmans P, Bron D. Human cytomegalovirus increases constitutive production of interleukin-6 and leukemia inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *Blood.* 1996;87:59-66
288. Duhrsen U, Hossfeld DK. Stromal abnormalities in neoplastic bone marrow diseases. *Ann Hematol.* 1996;73:53-70
289. Robledo MM, Sanz Rodriguez F, Hidalgo A, Teixeira J. Differential use of very late antigen-4 and -5 integrins by hematopoietic precursors and myeloma cells to adhere to transforming growth factor-beta1-treated bone marrow stroma. *J Biol Chem.* 1998;273:12056-12060
290. Levy Y, Brouet JC. Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. *J Clin Invest.* 1994;93:424-428
291. Baiocchi RA, Ross ME, Tan JC, Chou CC, Sullivan L, Halder S. Lymphomagenesis in the SCID-hu mouse involves abundant production of human interleukin-10. *Blood.* 1995;85:1063-1074
292. Gu ZJ, Costes V, Lu ZY, Zhang XG, Pitard V, Moreau JF, Bataille. Interleukin-10 is a growth factor for human myeloma cells by induction of an oncostatin M autocrine loop. *Blood.* 1996;88:3972-3986
293. Ramachandra S, Metcalf RA, Fredrickson T, Marti GE, Raveche E. Requirement for increased IL-10 in the development of B-1 lymphoproliferative disease in a murine model of CLL. *J Clin Invest.* 1996;98:1788-1793
294. Jurlander J, Lai CF, Tan J, Chou CC, Geisler CH, Schriber J, Blumenson LE, Narula SK, Baumann H, Caligiuri MA. Characterization of interleukin-10 receptor expression on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood.* 1997;89:4146-4152
295. Mori N, Gill PS, Moudgil T, Murakami S, Eto S, Prager D. Interleukin-10 gene expression in adult T-cell leukemia. *Blood.* 1996;88:1035-1045
296. Sjoberg J, Aguilar Santelises M, Sjogren AM, Pisa EK, Ljungdahl A, Bjorkholm M, Jondal M, Mellstedt H, Pisa P. Interleukin-10 mRNA expression in B-cell chronic lymphocytic leukaemia inversely correlates with progression of disease *Br J Haematol.* 1996;92:393-400
297. Korte A, Kochling J, Badiali L, Eckert C, Andrae J, Geilen W, Kebelmann-Betz C, Taube T, Wu S, Henze G, Seeger K. Expression analysis and characterization of alternatively spliced transcripts of human IL-7Ralpha chain encoding two truncated receptor proteins in relapsed childhood ALL. *Cytokine.* 2000;12:1597-1608
298. Marshall AJ, Fleming HE, Wu GE, Paige CJ. Modulation of the IL-7 dose-response threshold during pro-B cell differentiation is dependent on pre-B cell receptor expression. *J Immunol.* 1998;161:6038-6045
299. Quinn LS, Haugk KL, Grabstein KH. Interleukin-15: a novel anabolic cytokine for skeletal muscle. *Endocrinology.* 1995;136:3669-3672.
300. Tagaya Y, Bamford RN, DeFilippis AP, Waldmann TA. IL-15: a pleiotropic cytokine with diverse receptor/signaling pathways whose expression is controlled at multiple levels. *Immunity.* 1996;4:329-336
301. Angiolillo AL, Kanegane H, Sgadari C, Reaman GH, Tosato G. Interleukin-15 promotes angiogenesis in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;233:231-237.
302. Giri JG, Ahdieh M, Eisenman J, Shanebeck K, Grabstein K, Kumaki. Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *Embo J.* 1994;13:2822-2830
303. Henderson RA, Finn OJ. Human tumor antigens are ready to fly. *Adv Immunol.* 1996;62:217-256
304. Gruss HJ, Herrmann F, Gattei V, Gloghini A, Pinto A, Carbone A. CD40/CD40 ligand interactions in normal, reactive and malignant lympho-hematopoietic tissues. *Leuk Lymphoma.* 1997;24:393-422.
305. Carbone A, Gloghini A, Gattei V, Aldinucci D, Degan M, De Paoli P, Zagonel V, Pinto A. Expression of functional CD40 antigen on Reed-Sternberg cells and Hodgkin's disease cell lines. *Blood.* 1995;85:780-789.
306. Schattner EJ, Mascarenhas J, Reyfman I, Koshy M, Woo C, Friedman SM, Crow MK. Chronic lymphocytic leukemia B cells can express CD40 ligand and demonstrate T-cell type costimulatory capacity. *Blood.* 1998;91:2689-2697.
307. Chadban SJ, Tesch GH, Foti R, Lan HY, Atkins RC, Nikolic-Paterson DJ. Interleukin-10 differentially modulates MHC class II expression by mesangial cells and macrophages in vitro and in vivo. *Immunology.* 1998;94:72-78.

308. Song S, Ling Hu H, Roebuck KA, Rabbi MF, Donnelly RP, Finnegan A. Interleukin-10 inhibits interferon-gamma-induced intercellular adhesion molecule-1 gene transcription in human monocytes. *Blood*. 1997;89:4461-4469
309. Breitbart RE, Andreadis A, Nadal Ginard B. Alternative splicing: a ubiquitous mechanism for the generation of a multiple protein isoforms from single genes. *Annu Rev Biochem*. 1987;56:467-495
310. Sorg R, Enczmann J, Sorg U, Heermeier K, Schneider EM, Wernet P. Rapid and sensitive mRNA phenotyping for interleukins (IL-1 to IL-6) and colony-stimulating factors (G-CSF, M-CSF, and GM-CSF) by reverse transcription and subsequent polymerase chain reaction. *Exp Hematol*. 1991;19:882-887
311. Sorg RV, Enczmann J, Sorg UR, Schneider EM, Wernet P. Identification of an alternatively spliced transcript of human interleukin-4 lacking the sequence encoded by exon 2. *Exp Hematol*. 1993;21:560-563
312. Craig W, Poppema S, Little MT, Dragowska W, Lansdorp PM. CD45 isoform expression on human haemopoietic cells at different stages of development. *Br J Haematol*. 1994;88:24-30
313. Heaney ML, Vera JC, Raines MA, Golde DW. Membrane-associated and soluble granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor receptor alpha chain subunits are independently regulated in HL-60 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:2365-2369
314. Nakamura Y, Komatsu N, Nakauchi H. A truncated erythropoietin receptor that fails to prevent programmed cell death of erythroid cells. *Science*. 1992;257:1138-1141
315. Futatsugi A, Kuwajima G, Mikoshiba K. Tissue-specific and developmentally regulated alternative splicing in mouse skeletal muscle ryanodine receptor mRNA. *Biochem J*. 1995;305:373-378
316. Huang JP, Tang CJ, Kou GH, Marchesi VT, Benz EJ, Jr., Tang TK. Genomic structure of the locus encoding protein 4.1. Structural basis for complex combination patterns of tissue-specific alternative RNA splicing. *J Biol Chem*. 1993;268:3758-3766
317. Tsytisikov VN, Yurovsky VV, Atamas SP, Alms WJ, White B. Identification and characterization of two alternative splice variants of human interleukin-2. *J Biol Chem*. 1996;271:23055-23060
318. Frishman J, Long B, Knospe W, Gregory S, Plate J. Genes for interleukin 7 are transcribed in leukemic cell subsets of individuals with chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 1993;177:955-964
319. Alms WJ, Atamas SP, Yurovsky VV, White B. Generation of a variant of human interleukin-4 by alternative splicing. *Mol Immunol*. 1996;33:361-370
320. Atamas SP, Choi J, Yurovsky VV, White B. An alternative splice variant of human IL-4, IL-4 delta 2, inhibits IL-4-stimulated T cell proliferation. *J Immunol*. 1996;156:435-441
321. Kitamura N, Miyazawa K, Uehara Y, Komada M, Okajima A, Okigaki M, Kitamura A. Gene expression and regulation of HGF-SF. *EXS*. 1993;65:49
322. Pleiman CM, Gimpel SD, Park LS, Harada H, Taniguchi T, Ziegler SF. Organization of the murine and human interleukin-7 receptor genes: two mRNAs generated by differential splicing and presence of a type I-interferon-inducible promoter. *Mol Cell Biol*. 1991;11:3052-3059
323. Haudenschild DR, Moseley TA, Rose LM, Reddi AH. Soluble and transmembrane isoforms of novel interleukin-17 receptor-like protein by RNA splicing, and expression in prostate cancer. *J Biol Chem*. 2001;276:12121-12128
324. Raines MA, Liu L, Quan SG, Joe V, DiPersio JF, Golde DW. Identification and molecular cloning of a soluble human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:8203-8207
325. Ross RJ, Esposito N, Shen XY, Von Laue S, Chew SL, Dobson PR, Postel Vinay MC, Finidori J. A short isoform of the human growth hormone receptor functions as a dominant negative inhibitor of the full-length receptor and generates large amounts of binding protein. *Mol Endocrinol*. 1997;11:265-273
326. Tuypens T, Plaetinck G, Baker E, Sutherland G, Brusselle G, Fiers W, Devos R, Tavernier J. Organization and chromosomal localization of the human interleukin 5 receptor alpha-chain gene. *Eur Cytokine Netw*. 1992;3:451-459
327. Mosley B, Beckmann MP, March CJ, Idzerda RL, Gimpel SD, VandenBos T, Friend D, Alpert A, Anderson D, Jackson J, et al. The murine interleukin-4 receptor: molecular cloning and characterization of secreted and membrane bound forms. *Cell*. 1989;59:335-348
328. Goodwin RG, Friend D, Ziegler SF, Jerzy R, Falk BA, Gimpel S, Cosman D, Dower SK, March CJ, Namen AE, et al. Cloning of the human and murine interleukin-7 receptors: demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily. *Cell*. 1990;60:941-951
329. Park LS, Morrissey PJ, Davison B, Grabstein K. The role of IL-7 and its receptor in B-cell ontogeny. *Adv Exp Med Biol*. 1992;323:125-129
330. Armitage RJ, Ziegler SF, Beckmann MP, Idzerda RL, Park LS, Fanslow WC. Expression of receptors for interleukin 4 and interleukin 7 on human T cells. *Adv Exp Med Biol*. 1991;292:121-130

331. Mannervik B, Awasthi YC, Board PG, Hayes JD, Di Ilio C, Ketterer B, Listowsky I, Morgenstern R, Muramatsu M, Pearson WR. Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochem J.* 1992;282:305-316
332. Alexandrie AK, Sundberg MI, Seidegard J, Tornling G, Rannug A. Genetic susceptibility to lung cancer with special emphasis on CYP1A1 and GSTM1: a study on host factors in relation to age at onset, gender and histological cancer types. *Carcinogenesis.* 1994;15:1785-1790
333. Ingelman Sundberg M, Johansson I, Persson I, Yue QY, Dahl ML, Bertilsson L, Sjoqvist F. Genetic polymorphism of cytochromes P450: interethnic differences and relationship to incidence of lung cancer. *Pharmacogenetics.* 1992;2:264-271
334. Kelsey KT, Spitz MR, Zuo ZF, Wiencke JK. Polymorphisms in the glutathione S-transferase class mu and theta genes interact and increase susceptibility to lung cancer in minority populations (Texas, United States). 1997
335. Lazarus P, Sheikh SN, Ren Q, Schantz SP, Stern JC, Richie JP, Jr., Park JY. p53, but not p16 mutations in oral squamous cell carcinomas are associated with specific CYP1A1 and GSTM1 polymorphic genotypes and patient tobacco use. *Carcinogenesis.* 1998;19:509-514
336. Ambrosone CB, Freudenheim JL, Sinha R, Graham S, Marshall JR, Vena JE, Laughlin R, Nemoto T, Shields PG. Breast cancer risk, meat consumption and N-acetyltransferase (NAT2) genetic polymorphisms. *Int J Cancer.* 1998;75:825-830
337. Bailey LR, Roodi N, Verrier CS, Yee CJ, Dupont WD, Parl FF. Breast cancer and CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 polymorphisms: evidence of a lack of association in Caucasians and African Americans. *Cancer Res.* 1998;58:65-70
338. Rebbeck TR, Rosvold EA, Duggan DJ, Zhang J, Buetow KH. Genetics of CYP1A1: coamplification of specific alleles by polymerase chain reaction and association with breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1994;3:511-514
339. Wiencke JK, Pemble S, Ketterer B, Kelsey KT. Gene deletion of glutathione S-transferase theta: correlation with induced genetic damage and potential role in endogenous mutagenesis. 1995
340. Schroder KR, Wiebel FA, Reich S, Dannappel D, Bolt HM, Hallier E. Glutathione-S-transferase (GST) theta polymorphism influences background SCE rate. *Arch Toxicol.* 1995;69:505-507
341. Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, Ketterer B, Taylor JB. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. 1994
342. Ketterer B. Protective role of glutathione and glutathione transferases in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res.* 1988;202:343-361
343. Hallier E, Langhof T, Dannappel D, Leutbecher M, Schroder K, Goergens HW, Muller A, Bolt HM. Polymorphism of glutathione conjugation of methyl bromide, ethylene oxide and dichloromethane in human blood: influence on the induction of sister chromatid exchanges (SCE) in lymphocytes. *Arch Toxicol.* 1993;67:173-178
344. Hallier E, Schroder KR, Asmuth K, Dommermuth A, Aust B, Goergens HW. Metabolism of dichloromethane (methylene chloride) to formaldehyde in human erythrocytes: influence of polymorphism of glutathione transferase theta (GST T1-1). *Arch Toxicol.* 1994;68:423-427
345. Seidegard J, Vorachek WR, Pero RW, Pearson WR. Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. 1988
346. Stanulla M, Schrappe M, Brechlin AM, Zimmermann M, Welte K. Polymorphisms within glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and risk of relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: a case-control study. *Blood.* 2000;95:1222-1228.
347. Yuille M, Condie A, Hudson C, Kote-Jarai Z, Stone E, Eeles R, Matutes E, Catovsky D, Houlston R. Relationship between glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms and chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2002;99:4216-4218.
348. Davies SM, Bhatia S, Ross JA, Kiffmeyer WR, Gaynon PS, Radloff GA, Robison LL, Perentesis JP. Glutathione S-transferase genotypes, genetic susceptibility, and outcome of therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2002;100:67-71.
349. Voso MT, D'Alo F, Putzulu R, Mele L, Scardocci A, Chiusolo P, Latagliata R, Lo-Coco F, Rutella S, Pagano L, Hohaus S, Leone G. Negative prognostic value of glutathione S-transferase (GSTM1 and GSTT1) deletions in adult acute myeloid leukemia. *Blood.* 2002;100:2703-2707.
350. Nakachi K, Hayashi S, Kawajiri K, Imai K. Association of cigarette smoking and CYP1A1 polymorphisms with adenocarcinoma of the lung by grades of differentiation. *Carcinogenesis.* 1995;16:2209-2213
351. Nakachi K, Imai K, Hayashi S, Kawajiri K. Polymorphisms of the CYP1A1 and glutathione S-transferase genes associated with susceptibility to lung cancer in relation to cigarette dose in a Japanese population. *Cancer Res.* 1993;53:2994-2999

352. Hayashi S, Watanabe J, Kawajiri K. High susceptibility to lung cancer analyzed in terms of combined genotypes of P450IA1 and Mu-class glutathione S-transferase genes. 1992
353. Tefre T, Ryberg D, Haugen A, Nebert DW, Skaug V, Brogger A, Borresen AL. Human CYP1A1 (cytochrome P(1)450) gene: lack of association between the Msp I restriction fragment length polymorphism and incidence of lung cancer in a Norwegian population. *Pharmacogenetics*. 1991;1:20-25
354. Drakoulis N, Cascorbi I, Brockmoller J, Gross CR, Roots I. Polymorphisms in the human CYP1A1 gene as susceptibility factors for lung cancer: exon-7 mutation (4889 A to G), and a T to C mutation in the 3'-flanking region. 1994
355. Crofts F, Taioli E, Trachman J, Cosma GN, Currie D, Toniolo P, Garte SJ. Functional significance of different human CYP1A1 genotypes. 1994
356. Taioli E, Crofts F, Trachman J, Demopoulos R, Toniolo P, Garte SJ. A specific African-American CYP1A1 polymorphism is associated with adenocarcinoma of the lung. *Cancer Res*. 1995;55:472-473
357. Taioli E, Crofts F, Trachman J, Bayo S, Toniolo P, Garte SJ. Radical differences in CYP1A1 genotype and function. 1995
358. Kelsey KT, Wiencke JK, Spitz MR. A race-specific genetic polymorphism in the CYP1A1 gene is not associated with lung cancer in African Americans. *Carcinogenesis*. 1994;15:1121-1124
359. Cascorbi I, Brockmoller J, Roots I. A C4887A polymorphism in exon 7 of human CYP1A1: population frequency, mutation linkages, and impact on lung cancer susceptibility. *Cancer Res*. 1996;56:4965-4969
360. Cosma G, Crofts F, Currie D, Wirgin I, Toniolo P, Garte SJ. Racial differences in restriction fragment length polymorphisms and messenger RNA inducibility of the human CYP1A1 gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1993;2:53-57
361. Whitlock JP. Induction of cytochrome P450IA1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999;39:103-125
362. Chen H, Sandler DP, Taylor JA, Shore DL, Liu E, Bloomfield CD, Bell DA. Increased risk for myelodysplastic syndromes in individuals with glutathione transferase theta 1 (GSTT1) gene defect. *Lancet*. 1996
363. Krajcinovic M, Labuda D, Richer C, Karimi S, Sinnott D. Susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia: influence of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1, and GSTT1 genetic polymorphisms. *Blood*. 1999;93:1496-1501
364. Chen CL, Liu Q, Pui CH, Rivera GK, Sandlund JT, Ribeiro R, Evans WE, Relling MV. Higher frequency of glutathione S-transferase deletions in black children with acute lymphoblastic leukemia. 1997
365. Tew KD. Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. 1994
366. Tew KD, Monks A, Barone L, Rosser D, Akerman G, Montali JA, Wheatley JB, Schmidt DE, Jr. Glutathione-associated enzymes in the human cell lines of the National Cancer Institute Drug Screening Program. 1996
367. Widersten M, Pearson WR, Engstrom A, Mannervik B. Heterologous expression of the allelic variant mu-class glutathione transferases mu and psi. 1991
368. Lewis AD, Hickson ID, Robson CN, Harris AL, Hayes JD, Griffiths SA, Manson MM, Hall AE, Moss JE, Wolf CR. Amplification and increased expression of alpha class glutathione S-transferase-encoding genes associated with resistance to nitrogen mustards. 1988
369. Dirven HA, Dictus EL, Broeders NL, van Ommen B, van Bladeren PJ. The role of human glutathione S-transferase isoenzymes in the formation of glutathione conjugates of the alkylating cytostatic drug thiotepa. 1995
370. Dirven HA, van Ommen B, van Bladeren PJ. Involvement of human glutathione S-transferase isoenzymes in the conjugation of cyclophosphamide metabolites with glutathione. 1994
371. Dirven HA, Venekamp JC, van Ommen B, van Bladeren PJ. The interaction of glutathione with 4-hydroxycyclophosphamide and phosphoramidate mustard, studied by 31P nuclear magnetic resonance spectroscopy. 1994
372. Meyer DJ, Gilmore KS, Harris JM, Hartley JA, Ketterer B. Chlorambucil-monogluthionyl conjugate is sequestered by human alpha class glutathione S-transferases. 1992
373. Meyer DJ. Significance of an unusually low Km for glutathione in glutathione transferases of the alpha, mu and pi classes. 1993
374. Dirven HA, Megens L, Oudshoorn MJ, Dingemans MA, van Ommen B, van Bladeren PJ. Glutathione conjugation of the cytostatic drug ifosfamide and the role of human glutathione S-transferases. 1995